

Università degli Studi di Napoli Federico II
Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Tesi
Dottorato di Ricerca
in

Biologia Avanzata

Analisi molecolare
del comportamento di evitamento al chinino
in
Caenorhabditis elegans

AUTORE
Carmela Bergamasco

Correlatore
Dott.
Paolo Bazzicalupo

Coordinatore
Ch.mo Prof.
Silvana Filosa

Tutore
Ch.mo Prof.
Chiara Campanella

Anno accademico 2004/2005

*Analisi molecolare del comportamento di evitamento al chinino in
Caenorhabditis elegans*

Sommario

Introduzione

Il gusto

Anatomia generale del sistema gustativo

Meccanismi molecolari che mediano le modalità gustativi

*Descrizione generale del meccanismo di trasduzione del segnale mediato
dalle Proteine G eterotrimeriche*

Subunità G α ed effettori specifici

*Regolatori della via di trasduzione delle proteine G
eterotrimeriche*

I recettori dell'amaro nei mammiferi: la famiglia TAS2R

Trasduzione dell'amaro: Proteine G ed effettori attivati dalle proteine G

Meccanismi TAS2R indipendenti per il riconoscimento di composti amari

Questioni irrisolte relative alla percezione dell'amaro

**C. elegans: un organismo modello per l'analisi molecolare della percezione
chemiosensoriale dell'amaro**

C. elegans evita i composti percepiti amari dall'uomo

Il sistema nervoso del nematode è ampiamente conosciuto

Gli organi chemiosensoriali: gli amfidi e i fasmidi

Descrizione della ciglia sensoriale dei neuroni sensoriali di

C. elegans

Gli amfidi

I neuroni amfidiali

I Fasmidi

Differenze tra chemiotassi ed evitamento

*Approcci tecnici e genetico-molecolari facilitano lo studio di comportamenti
indotti da stimoli chemiosensoriali in C. elegans*

Il DiO

Costruzione di ceppi transgenici

Camaleon: sensore dell'attività neuronale di ASH

*Vantaggi offerti da C. elegans nella dissezione di vie di trasduzione del
segnale: banche dati, librerie plasmidiche e collezioni di ceppi mutanti*

C. elegans: biologia generale, anatomia, genoma e analisi genetica

Strategia Sperimentale

Approccio del miglior candidato

Studio di un nuovo gene qui-1: premessa

Studio del gene qui-1: attività di ricerca

Materiali e Metodi

Risultati

Approccio del miglior candidato

Analisi dell'evitamento al chinino di mutanti in geni codificanti i componenti molecolari della via di trasduzione del segnale mediata dalle proteine G eterotrimeriche

Analisi dell'evitamento al chinino di mutanti in geni espressi in ASH codificanti canali ionici

Analisi dell'evitamento al chinino di mutanti in geni codificanti molecole coinvolte nella neurotrasmissione.

Studio del gene qui-1: caratterizzazione

Analisi della Struttura esoni-introni del gene qui-1

Analisi del Profilo d'espressione

Costruzione del c-DNA di qui-1

Il gene qui-1 esercita la sua funzione in ASH

Produzione, purificazione ed esperimenti di immunolocalizzazione dell' anticorpo policlonale specifico anti-QUI-1.

Analisi della sequenza aminoacidica della proteina QUI-1

Individuazione di omologhi del gene qui-1 nelle altre specie

Analisi di RNAi di TO5C3.2

Studio della funzione di QUI-1

Analisi comportamentali di linee sovraesprimenti il gene sia in maniera generalizzata che selettivamente in ASH.

analisi di interazioni genetiche

Analisi dell'evitamento al chinino di animali doppi eterozigoti per il gene qui-1 e per geni coinvolti in importanti processi chemiorecettivi (formazione di ciglia sensoriale e trasduzione del segnale)

Sovraespressione della proteina GPA-3 nel mutante qui-1(gb404)

Analisi della espressione della proteina GPA-3 nel mutante qui-1(gb404)

Analisi delle interazioni genetiche tra i geni egl-10, gpa-1, qui-1, grk-2, gpa-3

Discussione

Bibliografia

Sommario

Nel presente lavoro di tesi di dottorato l'attività di ricerca è stata rivolta all'analisi molecolare del riflesso di evitamento, esibito dal nematode non parassita *Caenorhabditis elegans*, in risposta al chinino. Questo progetto s'inserisce negli studi relativi ai sistemi chemiosensoriali, in particolare all'analisi del gusto amaro nell'uomo.

Nell'uomo la percezione gustativa guida le scelte alimentari e controlla l'ingestione volontaria di sostanze. Il suo potere discriminatorio consente, infatti, di valutare la qualità del cibo, il valore nutrizionale di alcuni composti o la nocività di altri. Tra le cinque modalità gustative (dolce, amaro, aspro, salato, umami) riconosciute dall'uomo, il gusto amaro svolge un importante ruolo di difesa contro l'ingestione di composti tendenzialmente tossici, che vengono generalmente riconosciuti come amari. Questi includono molecole organiche prodotte da alcune piante (cafeina, nicotina, stricnina, chinino, β -glucopiranosidi), che hanno potenti effetti farmacologici, alcuni aminoacidi (triptofano) ed il denatonio, il composto più amaro riconosciuto dall'uomo, composti sintetici, ioni inorganici (Cu^{++} e Cd^{++}) e grassi rancidi.

Molti composti nocivi e tossici per gli animali, scartati dai mammiferi in saggi a doppia scelta e riconosciuti amari dall'uomo, sono percepiti come repellenti da *C. elegans* e scatenano una reazione di evitamento, che consiste in una brusca inversione della direzione del movimento. Ne deriva che la risposta di evitamento nei vermi ed il gusto amaro nell'uomo sembrano far parte di una stessa strategia attraverso cui gli animali limitano i danni causati da composti tossici presenti nell'ambiente.

Il presente studio quindi, utilizzando *C. elegans* come modello, si propone l'analisi del meccanismo molecolare che consente alle cellule sensoriali di identificare molecole tossiche, percepite come amare dall'uomo. In particolare l'analisi è incentrata sull'evitamento del chinino, un alcaloide estratto dalla corteccia delle piante di genere *Cinchona*. Questo composto ha vari effetti farmacologici ed è generalmente tossico per cellule ed organismi. Durante l'evoluzione l'uomo ha imparato a percepirlo come amaro e *C. elegans* ha imparato ad evitarlo.

L'esigenza di utilizzare il nematode come sistema modello per l'analisi molecolare della percezione dell'amaro, deriva dal fatto che le conoscenze relative alla base molecolare del gusto amaro risultano frammentarie. Se è noto per alcuni composti amari il coinvolgimento della via di trasduzione delle proteine G eterotrimeriche, inclusi alcuni effettori, e se per alcuni recettori accoppiati alla famiglia delle proteine G eterotrimeriche sono stati individuati i rispettivi agonisti (ad cicloesimide in topo,

salicina, feniltiocarbammide nell'uomo) non solo la maggior parte dei recettori specifici dei vari ligandi non è ancora stata individuata, ma le relazioni molecolari reciproche tra ligandi, recettori, effettori e attivazione di una cellula recettrice del gusto restano poco chiare. Resta oscuro quale meccanismo molecolare medi la codificazione dell'informazione sensoriale percepita dalla lingua per essere interpretata dai centri corticolali del gusto come percezione di amaro, dolce, salato, aspro e umami.

Non è inoltre noto, come venga realizzata la corretta architettura di una cellula sensoriale e se esistano proteine regolatorie dei componenti molecolari che mediano le diverse percezioni chemiosensoriali.

Inoltre solo saggi *in vitro*, *ex vivo* ed in colture cellulari sono stati condotti per indagare la base molecolari del gusto amaro. L'analisi *in vivo* della autentica funzione biologica di alcuni componenti molecolari (PLC β , TRPM5, TAR2) è stata effettuata solo parallelamente a questo lavoro (Zhang et al 2003, Mueller et al. 2005). Tuttavia i modelli in mammifero, data la natura complessa del sistema, manifestano il limite di non poter dissezionare le vie di trasduzione a livello di una singola cellula sensoriale, né a livello di una via nervosa.

Al contrario il nematode non parassita *Caenorhabditis elegans*, offre vantaggi unici per affrontare la problematica connessa alle relazioni esistenti tra geni, proteine, cellule sensoriali, circuiti neurali e risposte chemiosensoriali e per facilitarne la sintesi. Il suo sistema nervoso include soltanto 302 neuroni, caratterizzati sia per posizione che per connessione sinaptica. *C. elegans* è il primo organismo pluricellulare del quale è stato sequenziato il genoma e si distingue per un singolare connubio tra i caratteri pratici di un sistema biologico sperimentale e le numerose conoscenze collezionate in campo anatomico, fisiologico e dello sviluppo. Il nematode costituisce, inoltre, un animale modello di elezione, forse unico, per lo studio genetico di comportamenti semplici: le sue risposte a stimoli chimici si riducono a reazioni elementari, caratterizzate da un andamento spaziale e temporale di semplice caratterizzazione.

Nell'analisi molecolare dell'evitamento del chinino, il piano sperimentale adottato ha seguito due direttive principali:

- l'identificazione di componenti molecolari coinvolti nella risposta al chinino, sulla base dell'approccio del miglior candidato;
- lo studio di un nuovo gene, *qui-1*, necessario per il comportamento di evitamento al chinino, isolato precedentemente a questo lavoro.

Nel primo approccio mutanti in geni noti sono stati analizzati per la risposta di evitamento al chinino, mediante il Drop test. Si è indagato in particolare sul coinvolgimento nell'evitamento di geni codificanti componenti molecolari della via

di trasduzione del segnale mediata dalle proteine G eterotrimeriche, canali ionici coinvolti nella depolarizzazione delle ciglia sensoriali. Si è indagato sulla possibilità che il glutammato fosse il neurotrasmettitore che media la comunicazione tra il neurone sensoriale che recepisce il chinino e l'interneurone comando.

La caratterizzazione del gene *qui-1* ha previsto la descrizione completa della struttura esoni e introni del gene, la descrizione del suo profilo di espressione, la localizzazione della proteina, l'analisi in domini della proteina, l'identificazione degli omologhi nelle altre specie, il neurone sensoriale in cui il gene esercita la sua funzione, l'analisi di eventuali interazioni genetiche.

Introduzione

Il gusto

La sensibilità gustativa è la modalità chemiosensoriale preposta al riconoscimento di stimoli chimici idrosolubili in ciò che viene ingerito. Nonostante il numero e la varietà strutturale delle molecole che possono essere riconosciute, l'uomo può discriminare soltanto tra cinque modalità base del gusto: il dolce, l'amaro, il salato, l'aspro e l'umami (L-glutammato) (Lindemann, 1996). In ambito gastronomico, viene anche riconosciuto come gusto "il piccante", che però sul piano scientifico, non viene considerato un gusto vero e proprio, ma una sensazione di calore, mediata dal recettore della capsaicina presente su alcune cellule della mucosa orale (Caterina et al., 1997). La capsaicina è la molecola responsabile del "gusto" piccante. Nell'uomo la percezione gustativa serve in primo luogo a controllare l'ingestione volontaria di sostanze. Il suo potere discriminatorio consente di valutare la qualità del cibo, il valore nutrizionale di alcuni composti o la nocività di altri. La percezione dei sapori dolci, ad esempio, permette il riconoscimento di fonti di cibo ad alto contenuto calorico. La capacità di sentire come salati alcuni cationi monovalenti, specialmente il Na^+ , si è probabilmente evoluta per garantire l'omeostasi ionica ed idrica (Lindemann, 1996).

Tra le cinque modalità gustative riconosciute dall'uomo, il gusto amaro svolge un importante ruolo di difesa contro l'ingestione di composti tendenzialmente tossici, che vengono generalmente riconosciuti come amari. Questi includono molecole organiche prodotte da alcune piante (caffeina, nicotina, stricnina, chinino, β -glucopiranosidi), che inducono potenti effetti farmacologici, alcuni aminoacidi (triptofano) ed il denatonio, il composto più amaro riconosciuto dall'uomo, composti sintetici, ioni inorganici (Cu^{++} e Cd^{++}) e grassi rancidi. Fig.1.

L'uomo è in grado di riconoscere composti amari a basse concentrazioni (submicromolari) e mostra reazioni aversive verso cibi che sono riconosciuti eccessivamente amari.

Le percezioni gustative guidano le scelte alimentari compiute dagli uomini ed il ruolo della dieta può aver rivestito un ruolo importante nella salute e nella sopravvivenza durante il periodo dell'espansione umana nei nuovi ambienti

Studi recenti (Bufe et al., 2005; Soranzo et al., 2005) hanno ipotizzato una selezione positiva per aplotipi che conferiscono una maggiore sensibilità per tossine naturali amare. In particolare l'incrementata sensibilità conferita dall'allele N172 del recettore TAS2R16 può essere stata sottoposta a selezione positiva negli stadi iniziali dell'espansione umana. Il recettore TAS2R16 media la risposta a molti β -

glucopiranosidi (inclusi salicina, amigdalina). Questi sono diffusi in natura e hanno un'alta attività cianogenica tossica.

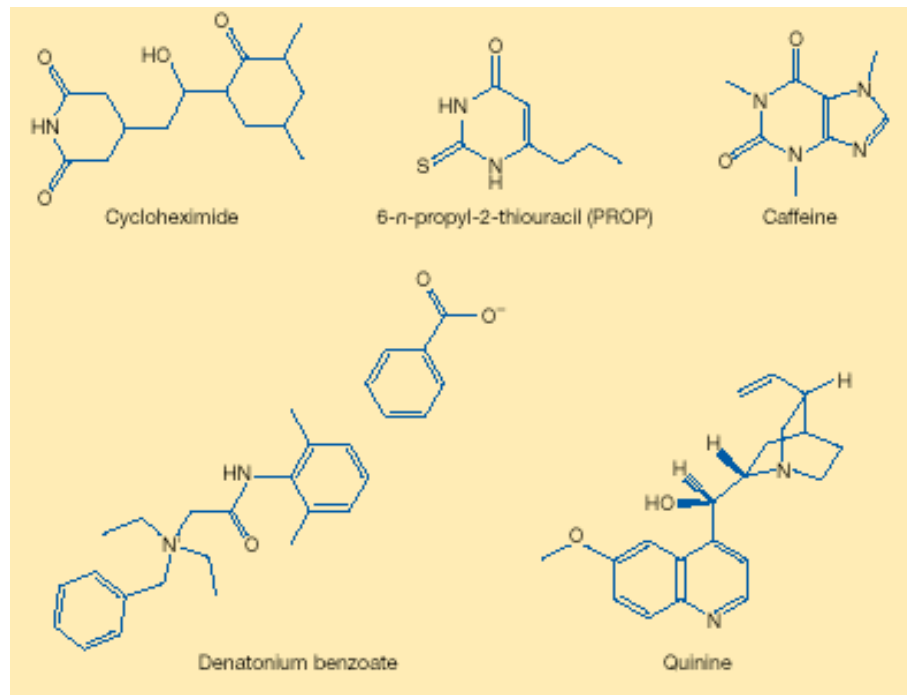


Fig.1 Struttura chimica di alcune sostanze percepite amare dall'uomo.

Anatomia generale del sistema gustativo

Nei mammiferi la percezione gustativa si realizza attraverso le gemme gustative, unità morfologiche e funzionali specializzate, che sono localizzate in tutto l'epitelio orale, sulla lingua, sul palato e sulla faringe. Le gemme gustative, a seconda delle specie, contengono aggregazioni di 50–150 cellule, includendo cellule precursori, cellule di supporto e cellule recettrici del gusto. Sulla lingua, le gemme gustative (fig.2), sono localizzate su specifiche protrusioni, le papille che vengono generalmente classificate in tre tipi morfologici con proprietà funzionali distinte.

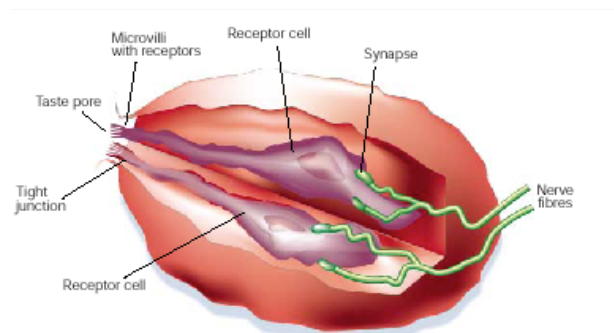


Fig.2 Morfologia di una gemma gustativa murina.

Rappresentazione schematica di una gemma gustativa in cui sono visibili due cellule recettrici del gusto (in viola) con i microvilli apicali e le sinapsi basolaterali. (Lindemann, 2001).

Tali caratteristiche, identificate già cento anni fa (Hänig 1901), sono state confermate di recente (Lindemann 1999) (fig.3). Si riconoscono papille circumvallate, fungiformi e foliate. Le papille circumvallate si trovano nella zona posteriore della lingua, in un numero che varia da 100 nel topo a circa 1000 nell'uomo e sono particolarmente sensibili alle sostanze amare. Le papille foliate sono localizzate nella porzione latero-posteriore della lingua, contengono da dozzine a centinaia di gemme gustative e sono sensibili al salato e all'amaro. Le papille fungiformi contengono una singola o poche gemme gustative, sono localizzate nella porzione anteriore della lingua e sembrano mediare la percezione di composti dolci.

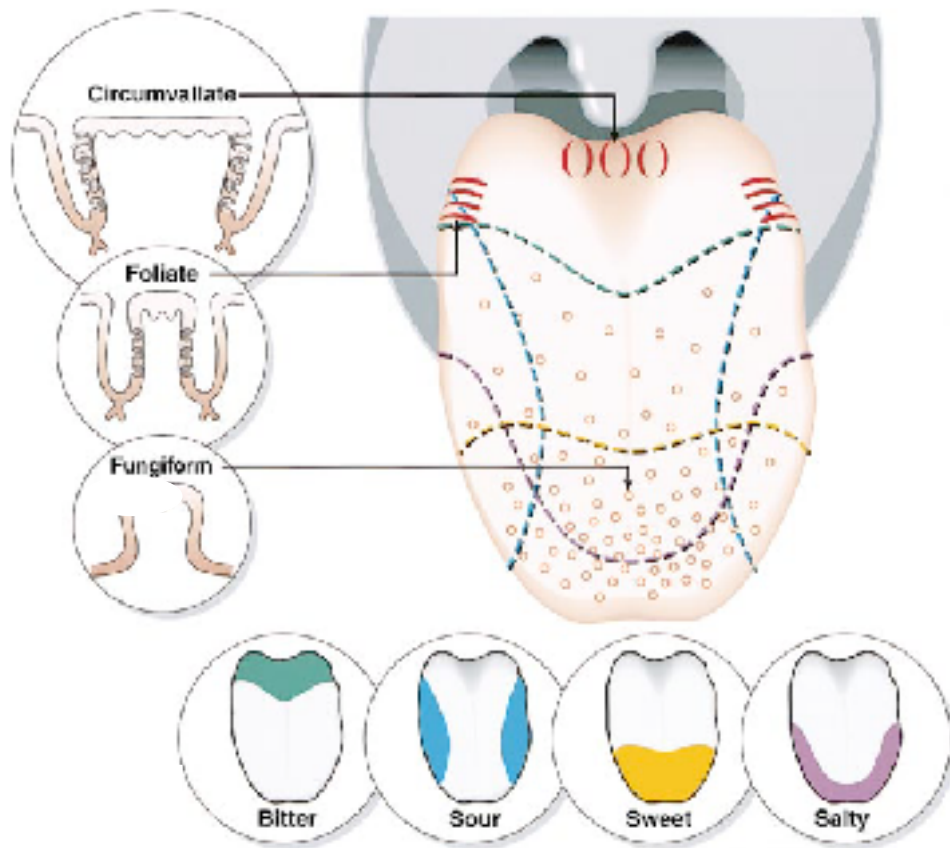


Fig.3 Anatomia funzionale della lingua nell'uomo.

Nel diagramma sono evidenziate le regioni specializzate per definiti stimoli gustativi (amaro, aspro, dolce e salato). Si nota che mentre differenti aree della lingua presentano forti preferenze per specifiche modalità gustative, esiste anche una significativa sovrapposizione tra le varie regioni. I tre tipi di papille gustative sono mostrate ingrandite e ne è mostrata la localizzazione nelle rispettive regioni (Hoon et al., 1999).

Le cellule deputate al riconoscimento di stimoli gustativi, non sono neuroni, come in *C. elegans*, ma cellule epiteliali modificate (fig.4) (Stone et al. 1995) connesse al cavo orale attraverso un sottile processo simile ad un dendrite. Le cellule recettrici del gusto presentano proprietà eccitatorie e sono attivate da stimoli gustativi (Avenet and Lindemann 1991; Cummings et al. 1993). La possibilità di generare potenziali d'azione nelle cellule gustative, come nei neuroni, è dovuta a canali Na^+ , K^+ e Ca^{++} voltaggio dipendenti (Lindemann 1996; Roper 1983).

Un'apertura alla superficie dell'epitelio, il poro gustativo permette l'accesso degli stimoli chimici ai recettori localizzati sui microvilli apicali delle cellule gustative. Il recettore, attivato in seguito alla stimolazione, genera una cascata trasduzionale che culmina nel rilascio di neurotrasmettitori al livello delle sinapsi con le fibre nervose (nervi facciale, vago e glossofaringeo) alla base delle gemme gustative. Le fibre nervose eccitate conducono lo stimolo, via talamo, ai centri corticali del gusto, dove l'informazione è integrata e processata. Questo processo è in larga parte sconosciuto.

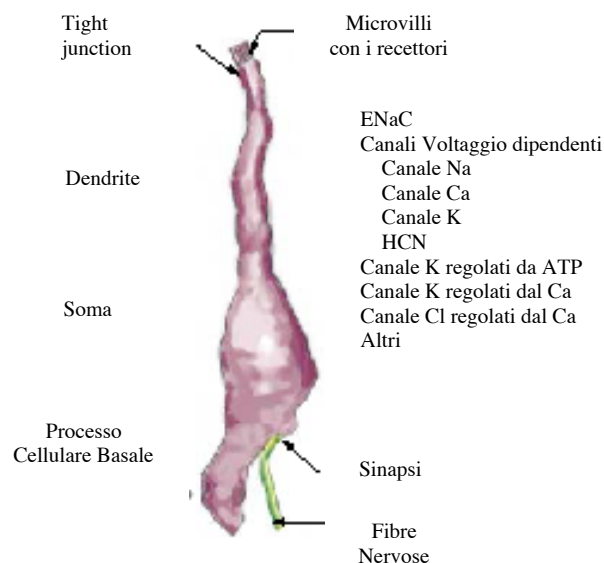


Fig.4 Cellula recettrice del gusto.

La cellula epiteliale modificata è simile ad un neurone bipolare, in cui le fibre nervose sono localizzate nella regione basolaterale. In figura sono mostrati alcuni dettagli morfologici e la localizzazione dei principali canali ionici identificati sulla membrana laterale (Lindemann, 2001).

Meccanismi molecolari che mediano le modalità gustative

I meccanismi di recezione degli stimoli gustativi possono essere generalmente raggruppati in due categorie:

- meccanismi con azione diretta su canali ionici (ENaC, "epithelial Na⁺ channel" e ASIC, "acid sensing ion channel") che determinano la depolarizzazione delle cellule recettrici del gusto (salato ed aspro) (Lindemann, 2001);
- interazione tra ligando e recettore appartenente alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G (aminoacidi, composti dolci, alcuni composti amari). (Adler et al., 2000; Chaudhari et al., 2000; Nelson et al., 2002; Nelson et al., 2001). La famiglia dei recettori GPCR - TAS1R codifica per 3 geni, TAS1R1, TAS1R2, TAS1R3, i cui prodotti funzionano come eterodimeri in sistemi di espressione eterologa e fungono da recettori per tutti i composti dolci (TAS1R 2+3). La combinazione TAS1R 1+3 media la percezione del glutammato. (Nelson et al., 2002). La famiglia TAS2R (Adler et al., 2000) media il riconoscimento di alcuni composti amari. Fig. 5 Nel presente lavoro si focalizza l'attenzione sulla percezione dell'amaro.

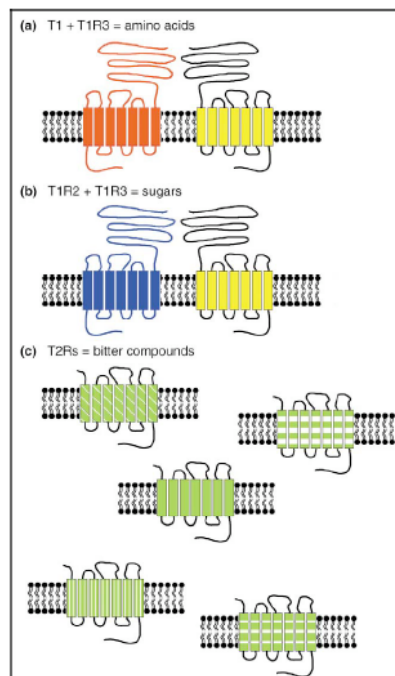


Fig.5 Due famiglie di chemiorecettori riconoscono amino acidi, zuccheri e composti amari.

(a) l'eterodimero T1R1/T1R3 riconosce gli aminoacidi, (b) l'eterodimero T1R2/T1R3 riconosce i composti dolci. (c) i 30 membri della famiglia T2R o TAS2R riconosce composti amari. (Scott et al. 2004)

Descrizione generale del meccanismo di trasduzione del segnale mediato dalle Proteine G eterotrimeriche

Tra i meccanismi molecolari adottati dalle cellule per convertire le variazioni d'informazioni extracellulari in variazioni di funzioni intracellulari, la trasduzione del segnale mediata dalle Proteine G eterotrimeriche svolge un ruolo fondamentale ed ubiquitario nel controllo e nella modulazione di una varietà di processi biologici, connessi alla comunicazione cellula – ambiente, cellula – cellula e cellule - matrice. Sono inclusi quelli coinvolti nella biologia chemiosensoriale (risposta a stimoli chimici volatili ed idrosolubili); nella neurotrasmissione, nella biologia dello sviluppo e nella progressione del cancro (p.e. moltiplicazione cellulare, differenziamento, apoptosi, etc.).

I componenti molecolari (fig. 6) di questo sistema includono:

- i recettori a serpentina esposti ai segnali extracellulari (GPCRs, G Protein Coupled Receptors);
- una grande varietà di ligandi (stimoli chimici, volatili ed idrosolubili, ormoni, neurotrasmettitori) con funzioni agoniste ed antagoniste;
- le proteine G eterotrimeriche (formate dalle subunità $G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$) e localizzate nel compartimento submembrana;
- una serie di effettori intracellulari (p.e. adenil ciclasi, canali ionici, fosfolipasi, fosfodiesterasi, etc.).

L'interazione di un ligando con il recettore (GPCR) lo attiva (GPCR*) e ne facilita l'accoppiamento alle proteine G eterotrimeriche ($G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$) localizzate nella faccia interna della membrana cellulare. L'accoppiamento GPCR*- proteina G, promuove lo scambio di GDP con GTP sulla subunità α . $G\alpha$ -GTP si dissocia da $G\beta\gamma$ e da GPCR*. A questo punto sia la subunità α che le subunità β e γ sono libere di attivare gli effettori intracellulari. Il segnale termina quando il fosfato γ del GTP viene rimosso dall'attività GTPasica intrinseca alla subunità α , lasciando il GDP legato alla $G\alpha$. La $G\alpha$ -GDP si riassocia con $G\beta\gamma$ completando il ciclo e resettando il sistema in modo che sia pronto a rispondere ad un nuovo segnale.

Subunità $G\alpha$ ed effettori specifici

Secondo una classificazione basata sulla correlazione delle sequenze aminoacidiche delle subunità α le proteine G sono distinte in tre famiglie : la prima famiglia comprende le proteine G_s (attivano l'adenilato ciclasi ed i canali Ca^{++}) e le proteine G_{olf} (attivano l'adenilato ciclasi nei neuroni sensoriali olfattivi); la seconda famiglia comprende le proteine G_i (inibiscono l'adenilato ciclasi; attivano i canali K^+), le

proteine G_o (attivano i canali K^+ , inattivano i canali Ca^{++} , attivano la fosfolipasi C- β); le proteine G_T (trasducina) (attivano la fosfodiesterasi del nucleotide ciclico cGMP nelle cellule a bastoncello dei vertebrati); la terza famiglia comprende le proteine G_q (attivano la fosfolipasi C specifica per fosfoinositidi)

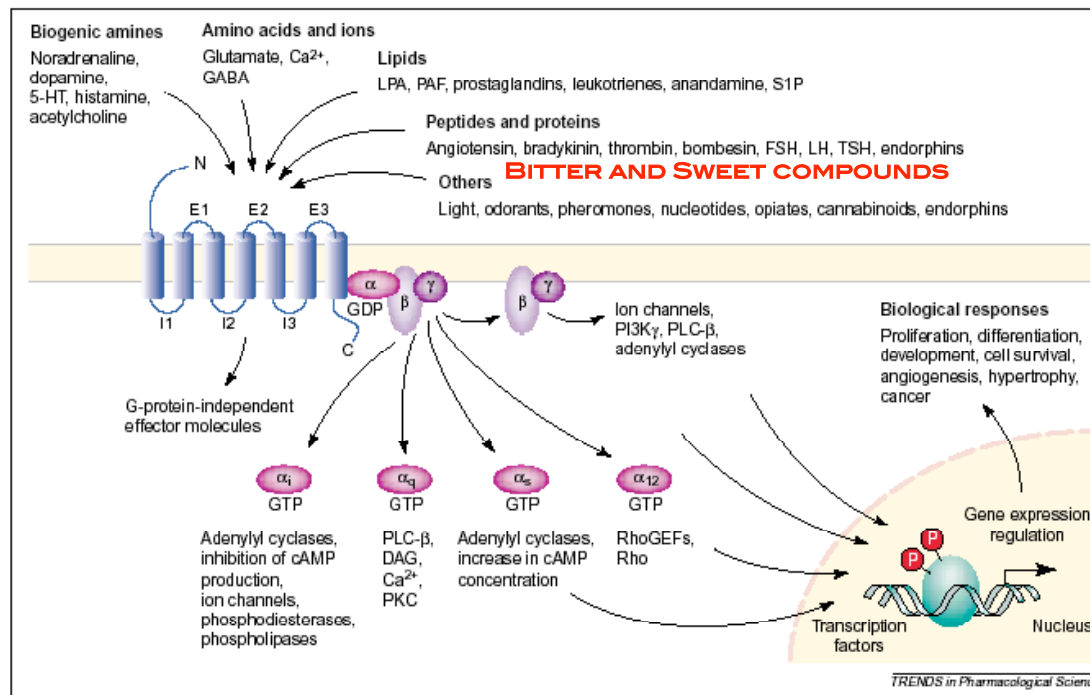


Fig.6 Descrizione schematica dei componenti molecolari che costituiscono le proteine G eterotrimeriche, (subunità α, β, γ) ed effettori specifici. Adattato da Marinissen and Gutkind, 2001

Regolatori della via di trasduzione delle proteine G eterotrimeriche

Nel corso degli ultimi anni è stata scoperta, una nuova classe di componenti di questa via del segnale, le proteine RGS (Regulators of G protein Signaling) che svolgono un ruolo regolativo fondamentale fig 7. Le prime RGS furono identificate perché capaci di modulare negativamente il segnale: l'RGS interagisce con specifiche $G\alpha$ -GTP attiva accelerandone grandemente l'attività GTPasica e riducendo così drasticamente la durata del segnale. Il numero delle proteine RGS scoperte è molto cresciuto negli ultimi 5-6 anni e recentemente esse sono state raggruppate in dieci classi, sulla base della composizione in domini (Siderovski and Willard, 2005) Elemento comune a tutte le RGS è la presenza dell'RGS box (circa 120 aminoacidi), fig.8.

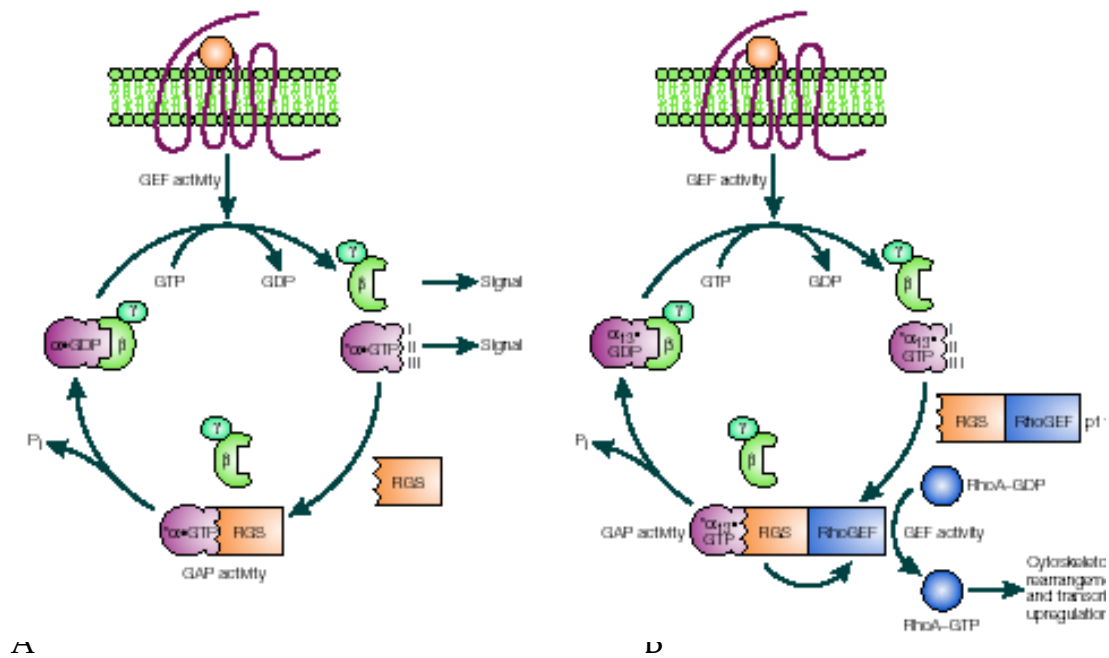


Fig.7 A. Inattivazione di G-protein signaling mediata dalle proteine RGS.

il recettore attivato agisce come un fattore di scambio del guanin nucleotide (GEF) per la subunità α , catalizzando lo scambio di GTP per GDP. Il legame con GTP determina una variazione conformazionale delle tre subunità portando al rilascio del complesso $G\beta\gamma$ e la propagazione del segnale attraverso sia i complessi $G\beta\gamma$ e $G\alpha$ -GTP. Le proteine RGS legano le regioni di switch delle subunità $G\alpha$ -GTP, stabilizzando lo stato di transizione per l'idrolisi di GTP. Questo processo accelera la velocità di idrolisi di GTP ("attività GAP"), determinando il rilascio del gruppo fosfato (P_i), ed il ritorno dell'inattivazione della forma trimerica $G\alpha\beta\gamma$ legata a GDP.

B. Ruolo addizionale della protein RGS, p115-RhoGEF nell'attivazione di Rho. Il dominio RGS di p115-RhoGEF agisce per inattivare la subunità α_{13} legata a GTP accelerando l'idrolisi di GTP. Allo stesso tempo il legame di α_{13} al dominio RGS attiva il dominio RhoGEF di p115-RhoGEF per catalizzare lo scambio di GTP per GDP sulla proteina G monomerica Rho. La proteina Rho attiva, legata a GTP è quindi capace di legare altre proteine nella cellula che in ultima analisi influenzano la struttura del citoscheletro e la trascrizione genica. Da (Neubig RR, 2002)

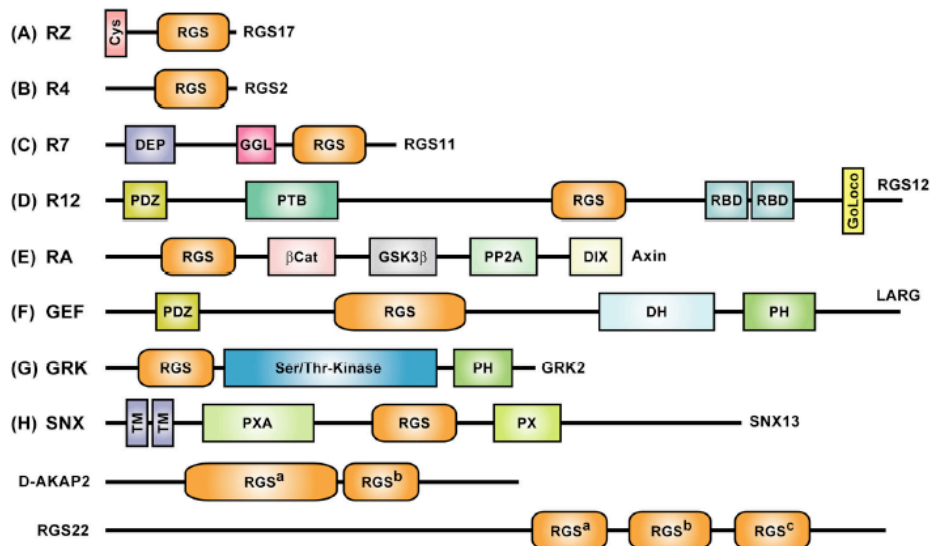


Fig.8 Architettura multimodulare dei membri rappresentativi delle sottofamiglie della superfamiglia delle proteine RGS nei mammiferi. Da (Siderovski and Willard, 2005)

Per queste proteine, meccanismi sia di tipo inibitorio che stimolatorio, sono stati dimostrati o ipotizzati. Per alcune è stato anche ipotizzato un ruolo nel mantenere insieme e nella corretta configurazione i vari componenti del signaling mediato da proteine G. Una sottoclasse di questa famiglia, il gruppo GRK2 (chinasi dei recettori delle proteine G eterotrimeriche) è coinvolta nella desensibilizzazione dei recettori a serpentina, inibendo la via di trasduzione. Nei mammiferi è stato ipotizzato che il complesso G $\beta\gamma$ è coinvolto nel meccanismo di adattamento del recettore. È stato proposto un modello in cui il legame di un agonista al recettore GPCR porta all'attivazione delle proteine G eterotrimeriche. Il complesso G $\beta\gamma$ libero, ma legato alla membrana, può interagire con la G Protein receptor kinase (GRK) e quindi indirizzare la chinasi al recettore. La conseguente fosforilazione del GPCR determina il reclutamento della proteina arrestina al recettore, attraverso cui si previene una ulteriore attivazione delle Proteine G. (Pitcher et al 1998). Questo fenomeno costituisce la base molecolare del fenomeno di desensitization o adaptation. Il ruolo molecolare del dominio RGS in questa sottoclasse al momento non è chiaro.

Molecole regolatorie multifunzionali sono la β -arrestina 1 e 2. Queste sono coinvolte nel riciclo dei recettori a serpentina e nel reclutamento, nell'attivazione e scaffolding di complessi molecolari di segnale citoplasmatici derivanti da vie di trasduzione diverse. (Lefkowitz and Shenoy, 2005).

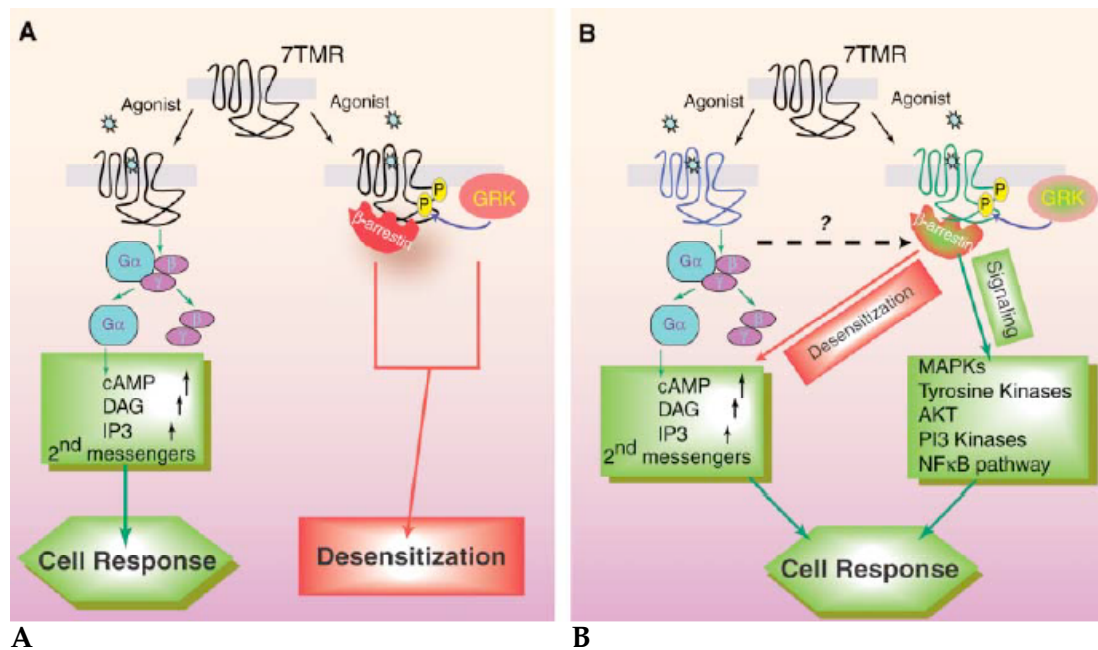


Fig 8. Trasduzione del segnale mediata dai recettori a serpentina. (A) Paradigma classico. La forma attiva del recettore (R^*) stimola le proteine G eterotrimeriche e viene rapidamente fosforilato da "G protein-coupled receptor kinases (GRKs), che porta al reclutamento della β -arrestina. Il recettore viene quindi desensitizzato ed il signaling viene fermato. (B) Nuovo paradigma. La β -arrestina non solo media la desensitizzazione del G protein-signaling but agisce essa stessa come effettore. Da Lefkowitz et al. 2005

I recettori dell'amaro: la famiglia TAS2R

La famiglia GPCR dei geni codificanti chemiorecettori di composti amari, TAS2R, è stata inizialmente individuata mediante un approccio combinato bioinformatico e di analisi genetica (Adler et al., 2000) (Bufe et al., 2002; Matsunami et al., 2000). Alcuni dei geni, identificati mediante analisi di banche dati genomiche murine e umane, mappavano all'interno di loci associati con varie sensibilità a composti amari (cicloesimide, chinino, raffinossio undacetato, saccarosio octacetato). Queste evidenze suggerivano che i geni codificanti recettori GPCR, appartenenti alla famiglia TAS2R, rappresentassero i recettori del gusto amaro. Studi di ibridazioni *in situ* suggeriscono che i geni delle famiglie TAS1R e TAS2R sono espressi in differenti sottopopolazioni di cellule gustative, suggerendo che la percezione del dolce e dell'amaro sono anche anatomicamente distinte (Adler et al., 2000).

Allo stato attuale la famiglia genica TAS2R comprende 33 membri funzionali in topo (Shi et al., 2003) e 25 membri potenzialmente funzionali nell'uomo. Le proteine TAS2R all'interno della stessa specie mostra dal 23% all'80% di identità. Nel genoma umano i geni codificanti queste proteine risiedono in tre regioni. 15 geni sono raggruppati sul cromosoma 12p13, 9 sul cromosoma 7q31 ed un singolo membro si

trova sul cromosoma 5p15. Questi geni contengono tutti un singolo esone codificante un recettore a serpentina della lunghezza media di 335 aminoacidi. I recettori presentano un corto dominio amino-terminale extracellulare e sequenza conservate nei domini transmembrana I, II, III, VII, e nel II loop intracellulare.

Studi di espressione, analisi di sistemi di espressione funzionale, studi di relazione tra attività e struttura, studi *in vitro* rafforzano l'ipotesi che la famiglia TAS2R codifichi per i recettori del gusto amaro. Il profilo di espressione dei recettori T2R sulla lingua dei roditori era consistente con il settore della percezione amara (Adler et al., 2000). Studi di espressione funzionale in topo hanno identificato il composto amaro cicloesimide, come agonista del recettore mTAS2R105 (Chandrashekar et al., 2000). Topi con variazioni di sensibilità alla cicloesimide erano portatori di varianti alleliche di mTAS2R105, meno responsive alla cicloesimide. Nell'uomo studi di espressione funzionale hanno recentemente accertato l'attivazione dei 25 recettori TAS2R in seguito ad applicazioni di appropriati stimoli amari (Meyerhof et al., 2005). La capacità di legare uno più agonisti per ogni recettore sembra inoltre essere dipendente non solo da un dato gene della famiglia TAS2R, ma anche dalla variazione allelica del gene stesso. Uno stesso recettore è attivato da composti simili. Cellule che esprimono il recettore TAS2R16 rispondono alla salicina e β -glucosidi correlati, mentre cellule trasfettate con altri costrutti hTAS2R, non esibiscono risposta. Il recettore T2RT10 esibisce attivazione in risposta alla stricnina. (Bufe et al., 2002) Il recettore hTAS2R38 (Kim et al., 2003) è attivato da pheniltiocarbamide e da molti altri composti contenenti il gruppo $-N=C=S$, inclusa la propiltiourea. Un esempio isolato è rappresentato dal recettore hTAS2R14 (Behrens et al., 2004) che è attivato *in vitro* da diversi composti (acido naftaldeidico, acido piperonilico, sodio benzoato). Sebbene essi condividano uno o più sistemi ad anello ed almeno una catena elettronegativa, questi parametri sono presenti in altri composti che non attivano il recettore.

Alti livelli di variazioni alleliche sono state infatti trovate all'interno dei loci TAS2R nelle popolazioni umane. Questa variabilità correla con l'enorme variabilità nella percezione di composti amari riscontrata nell'uomo. Le diversità nei geni TAS2R potrebbero essere dovuti alla selezione naturale, che può aver favorito alleli maggiormente responsivi a tossine naturali amare prodotte dalle piante.

Studi recenti hanno dimostrato che i geni TAS2R sono necessari e sufficienti per il riconoscimento di composti amari e che la percezione sensoriale (dolce o amara) che deriva dal loro riconoscimento deriva dalla sottopolazione di cellule recettrici del gusto in cui sono espressi. (Mueller et al., 2005)

In topo la sensibilità al chinino sembra essere poligenica. Il locus maggiore del tratto quantitativo responsabile della sensibilità al chinino è stato ristretto su un intervallo

di 5Mb del cromosoma 6 che include 24 geni codificanti TAS2R. un secondo locus è stato mappato su cromosoma 8, che non contiene TAS2R, ma un numero di geni codificanti canali ionici, enzimi e membri di altre famiglie di recettori. (Nelson et al., 2005)

Trasduzione dell'amaro: Proteine G ed effettori attivati dalle proteine G

Nella trasduzione dell'amaro sono state individuate almeno due subunità $G\alpha$. L' α -gustducina è espressa nelle gemme gustative di tutte le papille (circumvallate, foliate e fungiformi), ma non è espressa nelle porzioni non sensoriali della lingua né è espresso negli altri tessuti analizzati (Wong et al., 1996). Topi knock-out per la α -Gustducina esibiscono una riduzione di repulsione verso composti amari (denatonio benzoato e chinino solfato) e ridotte risposte a composti amari nei nervi gustatori (Wong et al., 1996). Il recettore mTAS2R105 accoppia in vitro la α -Gustducina (Chandrasekar et al., 2000). Studi recenti indicano l'attività della subunità $G\alpha_{12}$.

In risposta a composti amari le subunità $G\beta_3$, $G\gamma_{13}$, insieme alla gustducina mediano nei tessuti gustativi un aumento dei livelli di inositolo trifosfato (IP_3) e di diacilglicerolo (DAG). (Huang et al., 1999) (Rossler et al., 2000) ed una diminuzione di nucleotidi ciclici (c-AMP) (Yan et al., 2001). Queste molecole sono coesprese nelle cellule gustative. (Clapp et al., 2001). Nella percezione dell'amaro sono stati descritti essere coinvolti i canali ionici TRPM5, "un canale cationico aperto da Ca^{++} " (Perez et al., 2002) e la fosfolipasi $PLC\beta_2$ (Zhang et al., 2003). Esperimenti di RT-PCR, ibridazioni *in situ*, saggi *in vitro* suggeriscono un ruolo regolatorio della proteina RGS21 nei processi di trasduzione del gusto amaro. (von Buchholtz et al., 2004).

Sulla base dell'individuazione di queste molecole è stato ipotizzato che l'attivazione delle cellule recettrici del gusto avvenga mediante il rilascio di ioni Ca^{++} dalle riserve intracellulari, e dall'attivazione di canali regolati da c-AMP (Misaka, 1997).

Meccanismi TAS2R indipendenti per il riconoscimento di composti amari

Studi di fisiologia suggeriscono che la trasduzione di composti amari anfifilici, come il chinino ed il denatonio benzoato possono stimolare le cellule recettrici del gusto indipendentemente dai recettori GPCR (Caicedo, 2003). Il chinino, può direttamente attivare le proteine G eterotrimeriche e sia il chinino che il denatonio possono bloccare i canali del K^+ (Seto et al 1999, Tsunenari et al 1996). La caffeina inibisce direttamente le fosfodiesterasi intracellulari (Rosenzweig et al 1999).

Questioni irrisolte relative alla percezione dell'amaro

La percezione dell'amaro è stata indagata attraverso saggi *in vitro*, saggi di espressione funzionale in colture cellulari e saggi *ex vivo* che hanno evidenziato una relazione funzionale tra composti amari recettori, effettori e canali ionici. Studi *in vivo* che confermano l'autentica funzione biologica delle molecole descritte sono rari e sono stati realizzati solo parallelamente allo svolgimento dell'attività di ricerca presentata in questa tesi (Mueller et al., 2005; Zhang et al., 2003). Ne consegue che sebbene fortemente arricchito nel corso degli ultimi cinque anni, lo scenario molecolare attualmente descritto essere coinvolto nella percezione dell'amaro è frammentario.

Se è stata chiarificatrice l'individuazione del coinvolgimento del meccanismo di trasduzione del segnale delle Proteine G eterotrimeriche, sulla base del fatto che tutti i GPCR caratterizzati della famiglia TAS2R sono responsivi a composti amari è possibile solo stabilire che i TAS2R riconoscono la maggior parte dei composti amari. Anche se molti agonisti specifici devono ancora essere individuati.

In particolare restano aperte diverse questioni chiave relative ai componenti molecolari che mediano la percezione dell'amaro:

- se altri recettori che accoppiano la gustducina possano essere capaci di sostituire la funzione dei recettori TAS2R;
- quali geni regolano l'attività dei recettori TAS2R, se mutazioni in questi geni inibiscano l'espressione dei TAS2R e quale sia il fenotipo associato nell'uomo; se questi geni possano essere isolati nell'uomo, e se possano essere coinvolti in altri meccanismi di trasduzione, connessi ad altri processi biologici, dato il ruolo integrale ed ubiquitario svolto dalle Proteine G eterotrimeriche;
- non tutte le cellule sensibili ai composti amari esprimono la α -Gustducina; topi difettivi per l' α -gustducina, hanno una ridotta, ma non completamente abolita sensibilità al chinino ed al denatonio (Wong et al., 1996) e l'incidenza delle cellule responsive all'amaro ridotta del 70%, ma non completamente. Resta quindi da indagare se nella trasduzione dell'amaro, oltre all' α -gustducina e alla subunità $G\alpha_{12}$, subunità $G\alpha$ addizionali delle Proteine G eterotrimeriche siano coinvolte, quali possano essere le relazioni e i meccanismi specifici in cui esse siano coinvolte. Se queste possano essere isolate e caratterizzate in uomo e se uno stesso recettore sia accoppiato a Proteine G diverse;
- e, in relazione specificamente al chinino, se le cellule in cui questo composto media i suoi effetti farmacologici, impieghino sistemi

molecolari differenti rispetto a quelli utilizzati dalle cellule gustative per riconoscerlo.

Resta da quindi da chiarire la relazione molecolare tra i TAS2R e la percezione dell'amaro. Restano ancora poco conosciute le relazioni reciproche dei singoli componenti molecolari all'interno delle cellule gustative nonché i contributi relativi dei meccanismi TAS2R dipendenti e TAS2R indipendenti per il riconoscimento di degli stimoli amari. La questione viene ulteriormente complicata dall'evidenza che molti componenti che mediano la modalità sensoriale dell'amaro (α -Gustducina, PLC β) sono coinvolte anche nella percezione del dolce e dell'umami.

In definitiva approcci bioinformatici, studi di espressione, esperimenti *in vitro*, sistemi di espressione eterologa hanno individuato i componenti molecolari, che in condizioni sperimentali, riconoscono composti percepiti amari dall'uomo ed attivano risposte cellulari, ma non si è ancora giunti a definire il complesso degli eventi molecolari che, in un animale vivo, trasformano il riconoscimento di un composto, in percezione dell'amaro.

***C. elegans*: un organismo modello per l'analisi molecolare della percezione chemiosensoriale dell'amaro**

Il nematode non parassita *Caenorhabditis elegans*, fig. 9, è un buon sistema biologico modello per lo studio del gusto amaro. Caratteristiche biologiche, versatilità sperimentale, informazioni relative al genoma e al funzionamento del sistema nervoso, sofisticati approcci genetico-molecolari consentono di studiare la reazione indotta in seguito alla percezione di uno stimolo chemiosensoriale a livello di un singolo gene e di combinazioni genetiche precise, sia a livello di una singola cellula che a livello di un singolo circuito neurale, in un animale vivo, in tempi brevi.

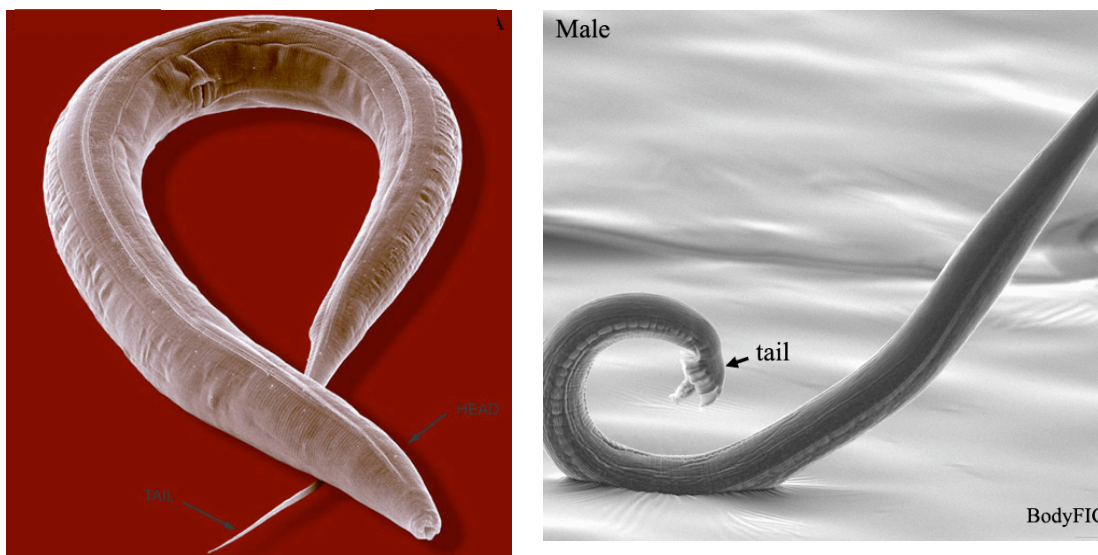


Fig. 9 Ermafrodita e maschio in *C. elegans*

***C. elegans* evita i composti percepiti amari dall'uomo**

C. elegans riconosce come repellenti i composti amari (ad es. chinino e altri alcaloidi) ed esibisce una caratteristica reazione di evitamento quando li incontra nell'ambiente (Hilliard et al. 2004). L'evitamento nei nematodi sembra essere correlato al gusto amaro nell'uomo. Queste modalità chemiosensoriali sembrano appartenere ad una strategia comune di difesa adottata dagli animali per difendersi da composti chimici potenzialmente tossici presenti nell'ambiente. Il comportamento di evitamento è di semplice caratterizzazione e consiste in una brusca inversione della direzione di movimento, si osserva entro 2 sec dall'incontro con il repellente; inoltre un saggio comportamentale, il Drop Test (Hilliard et al 2002) fig.10 consente di descriverlo quantitativamente sia in un singolo animale che a livello di una popolazione.

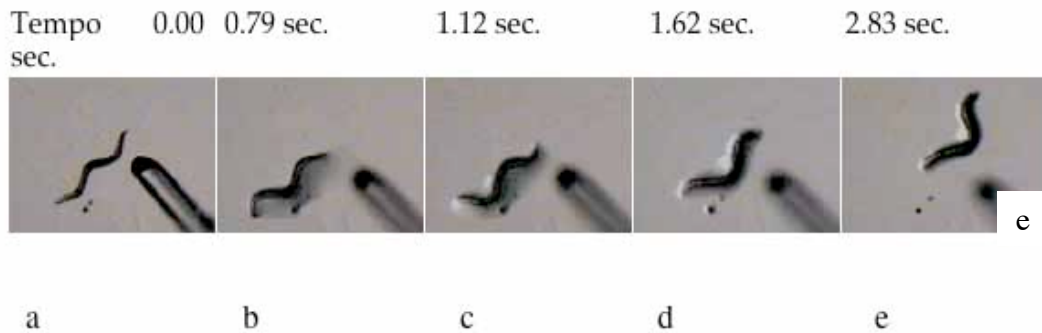


Fig.10 Il *Drop Test* consiste nel porre una goccia dal volume di circa 5 nl, vicino alla coda di un verme che si muove in avanti (a, b): essa per capillarità raggiunge la parte anteriore dell'animale (c, d), dove viene a contatto con le ciglia sensoriali degli organi chemiorecettori. Sostanze repellenti saggiate in questo modo producono nel nematode una risposta di evitamento (e): l'animale saggiato inverte bruscamente il movimento in avanti iniziandone uno all'indietro. Viceversa, quando la sostanza depositata non è sentita come repellente l'animale continua il suo movimento in avanti. Ogni risposta di evitamento è registrata entro quattro secondi dalla deposizione della goccia (Hilliard et al., 2002).

Il sistema nervoso del nematode è ampiamente conosciuto

Caratteristica unica nell'ambito dei metazoi è la descrizione dettagliata del sistema nervoso di *C. elegans*.

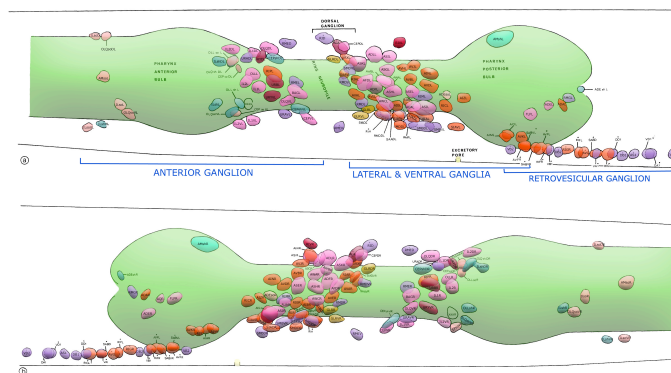


Fig.11 Rappresentazione schematica della localizzazione dei neuroni in *C. elegans* (www.wormbase.org)

Caratterizzato attraverso microfotografie seriali al microscopio elettronico, include 302 neuroni, descritti per singola posizione, (Ward et al., 1975; White et al., 1987), circa 5000 sinapsi, 600 gap junctions e 2000 giunzioni neuromuscolari (Durbin 1987). Gli studi comportamentali sono agevolati da un ulteriore vantaggio. A differenza

del topo e della *Drosophyla*, la variabilità fenotipica dovuta alla variabilità genetica è un problema raro. La deriva genetica è inoltre minimizzata grazie alla possibilità di congelare i nematodi. Molte mutazioni che colpiscono lo stesso sistema nervoso sono compatibili con la vita, almeno nelle condizioni di laboratorio (Brenner, 1974a). Il sistema riproduttivo di tipo ermafrodita autosufficiente consente la riproduzione di ceppi recanti mutazioni che determinano fenotipi severi. Tuttavia la presenza di maschi, che vengono generati con una frequenza pari a 0,5%, facilita l'analisi delle interazioni genetiche.

Gli organi chemiosensoriali: gli amfidi e i fasmidi

I principali organi chemiosensoriali coinvolti nel comportamento di evitamento al chinino sono gli amfidi, localizzati nell'estremità cefalica, e i fasmidi, localizzati nell'estremità caudale, entrambi disposti bilateralmente (fig.12).

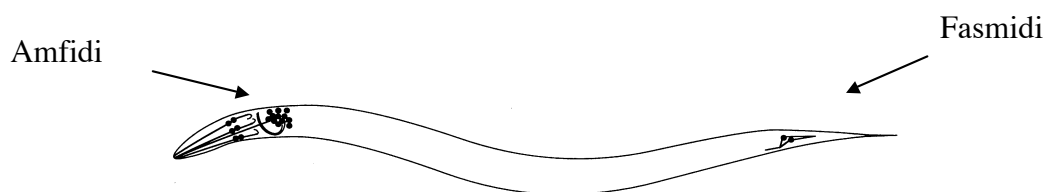


Fig.12 Rappresentazione schematica della posizione degli Amfidi e dei Fasmidi

Gli amfidi ed i fasmidi sono costituiti da neuroni bipolari (fig.13) in cui si distinguono un corpo cellulare, un lungo dendrite con un'estremità specializzata ciglia sensoriale, ed un assone, che si connette al *nerve ring*, il principale centro di integrazione del sistema nervoso di *C. elegans*.

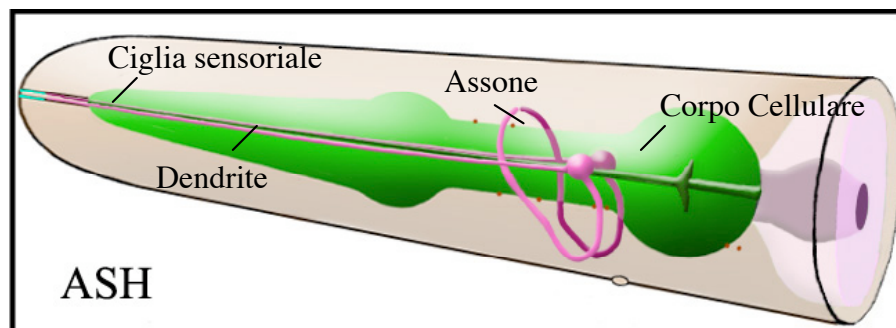


Fig13 Rappresentazione schematica della morfologia di un neurone chemiosensoriale

Descrizione della ciglia sensoriale dei neuroni sensoriali di *C. elegans*

Le ciglia sensoriali sono esposte all'ambiente esterno e rappresentano il compartimento cellulare in cui avviene il riconoscimento del segnale e l'immediata attivazione della via di trasduzione del segnale che consente di trasmettere l'informazione chemiosensoriale riconosciuta, in senso centripeto, innescando i meccanismi molecolari che mediano la risposta comportamentale indotta dalla percezione chemiosensoriale.

Le ciglia sono estemità dendritiche specializzate in funzioni mobili o sensoriali le cui disfunzioni sono associate nell'uomo a diverse patologie come la sindrome di Bardet-Biedl.

Negli assonemi, sensoriali e mobili, sono riconoscibili tre regioni strutturali fig. 14: un'estremità basale o zona di transizione, un segmento intermedio, costituito da doppietti di microtubuli, un segmento distale, costituito da microtubuli singoli. In generale, i componenti del trasporto intraflagellare (IFT) assemblano e mantengono la ciglia trasportando i precursori ciliari, legati ad un complesso di proteine (complesso IFT-A e complesso IFT-B), dalla base della ciglia fino al sito della loro incorporazione sull'estremità distale.

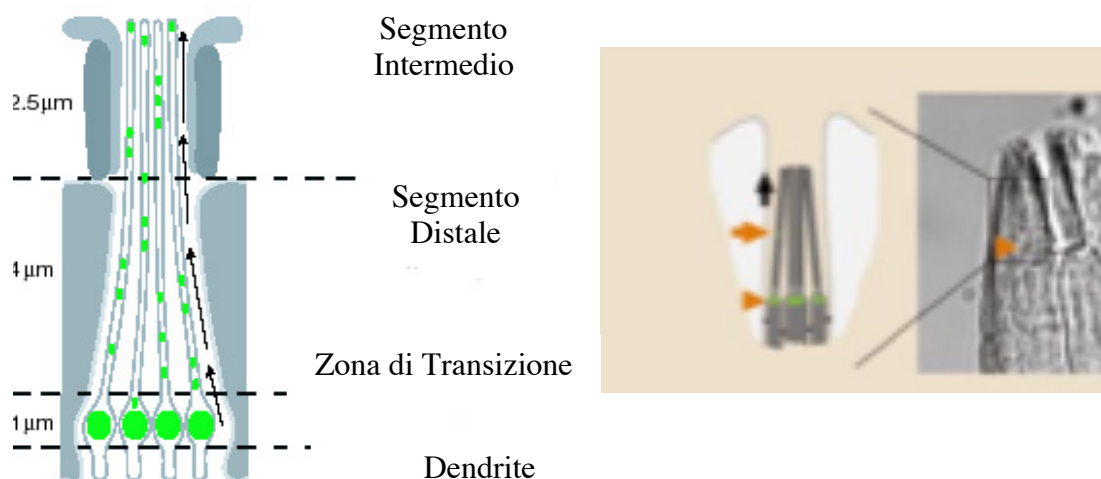


Fig14. Rappresentazione dei compartimenti spaziali (Zona di Transizione, Segmento Intermedio, Segmento Distale) riconoscibili in una ciglia sensoriale (Snow et al 2004).

In *C. elegans*, due sistemi di trasporto sequenziale di IFT vengono utilizzati per costruire le ciglia sensoriali dei neuroni: un sistema di trasporto guidato da due

motori molecolari, la kinesina II e la kinesina OSM-3, determina la formazione del segmento intermedio, lungo $4\text{ }\mu\text{m}$, in cui i doppietti di microtubuli sono estesi a partire dal corpo basale; un sistema di trasporto guidato esclusivamente dalla kinesina OSM-3, media la formazione del segmento distale di microtubuli singoli che si estendono per una lunghezza di $2,5\text{ }\mu\text{m}$. I complessi IFT A e IFT B si muovono ad una velocità di $0,7\text{ }\mu\text{m/sec}$ nel segmento intermedio e di $1,3\text{ }\mu\text{m/sec}$ nel segmento distale. La kinesina-II è eterotrimerica, consiste del motore KRP85, un complesso accessorio, KRP95 codificato dai geni *klp-11*, *klp-20* and *kap-1*) e dalla kinesina omodimerica OSM-3. Le proteine BBS-7 e BBS-8 stabilizzano i complessi IFT A e IFT B, associati al complesso della kinesina II direttamente, e attraverso la proteina DYF-1, alla kinesina OSM-3. (Ou et al., 2005)

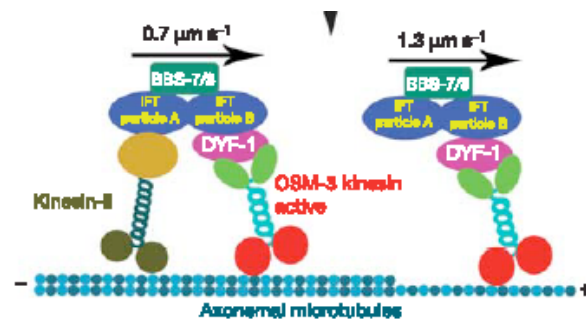


Fig.15 Descrizione dei componenti molecolari responsabili del trasporto e dell'assemblaggio delle ciglia sensoriali in *C. elegans*. (Ou et al. 2005)

Gli amfidi

Ogni amfide è formato da 12 neuroni sensoriali e da 2 cellule di supporto, definite cellule *sheath* (guaina) e *socket* (cavità) (fig.16) (Ward et al., 1975).

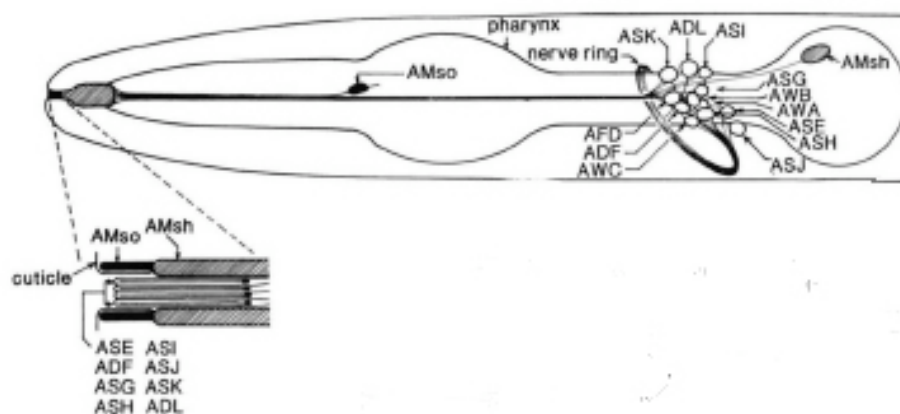


Fig.15 Rapporti anatomici relativi tra i neuroni sensoriali amfidiali, le ciglia sensoriali e le labbra laterali. I neuroni amfidiali fig15A, sono localizzati

anteriormente al secondo bulbo della faringe, da essi dipartono longitudinalmente-anteriormente e comunicano all'esterno con delle estremità specializzate, le ciglia sensoriali fig.15C, che sono in contatto con l'ambiente esterno attraverso il poro amfidiale fig.15B. Le *sheath cell* formano un canale cilindrico che si apre sulla cuticola delle due labbra laterali mediante il poro amfidiale costituito dalla *socket cell*. Le ciglia sensoriali dei neuroni amfidiali comunicano all'esterno attraverso questo poro che si apre in prossimità delle labbra laterali. La *socket cell* sembra agire come una cellula ipodermica; la *sheath cell* è, invece, simile ad una cellula gliale che avvolge le estremità dei neuroni. (White et al., 1987).

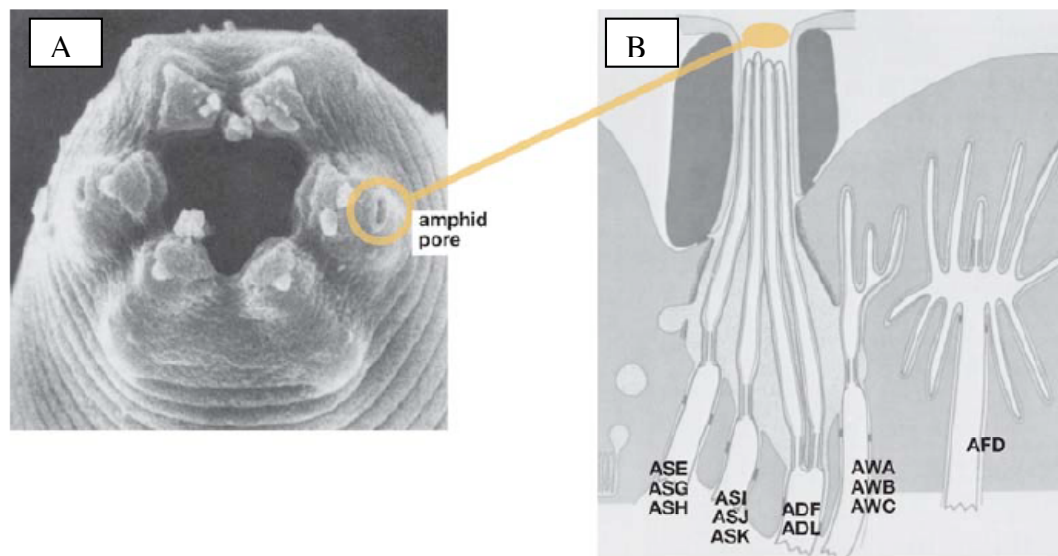


Fig17 Le ciglia sensoriali (B) attraversando il canale amfidiale sono in contatto con l'ambiente grazie al poro amfidiale, posto in prossimità delle labbra laterali.

I neuroni amfidiali

I neuroni che costituiscono gli amfidi sono distinguibili per morfologia e per le connessioni con gli altri neuroni; inoltre in base alla morfologia dei ciglia ed alla funzione è possibile raggrupparli in tre classi:

- I neuroni amfidiali con funzione chemiorecetttrice (ADF, ADL, ASE, ASG, ASH, ASI, ASJ, ASK), presentano una o due sottili estremità ciliate che si estendono fino al poro amfidiale e vengono in contatto con l'ambiente esterno. Essi sono deputati a sentire la maggior parte delle molecole idrosolubili (tabella 1), (Bargmann and Horvitz, 1991; Bargmann et al., 1990; Kaplan and Horvitz, 1993; Troemel et al., 1995)

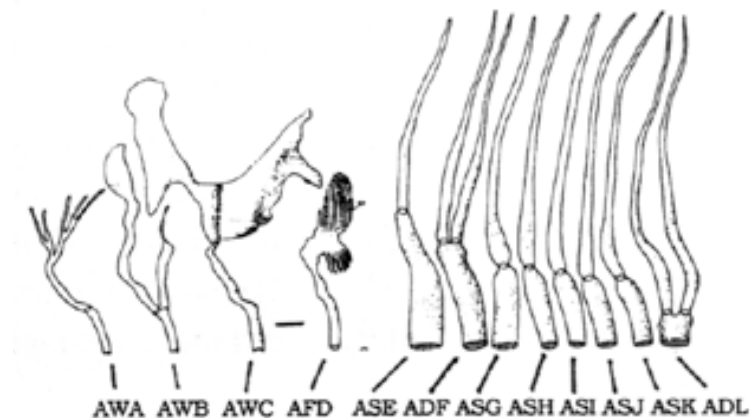


Fig.18

I neuroni che identificano molecole volatili (AWA, AWB, AWC) (Bargmann et al., 1993), sono caratterizzati da estremità appiattite che entrano nel canale formato dalla *sheath cell*, ma poi ognuna di esse, indipendentemente dalle altre, si invagina all'interno della *sheath cell*, in prossimità della zona in cui il fascetto delle ciglia del canale entra nella *socket cell*. Tali cellule, per la caratteristica morfologia dei processi dendritici vengono definite cellule alate.

Infine, un unico neurone (AFD), preposto al riconoscimento di stimoli termici (Mori and Ohshima, 1995) resta separato dagli altri dendriti all'interno della *sheath cell*.

Gli studi di microchirurgia con raggio laser, effettuati sui neuroni amfidiali, indicano che ogni cellula neuronale presenta una relativa specificità sensoriale. In generale:

- attrattanti e repellenti sono riconosciuti da neuroni differenti; questa caratteristica ricorda la situazione osservata nei mammiferi in cui cellule gustative differenti riconoscono specificamente composti dolci e amari.
- neuroni sensoriali responsivi alle sostanze idrosolubili sono diversi da quelli che mediano il riconoscimento di molecole volatili (Bargmann et al., 1993) ad eccezione del neurone ASH, definito polimodale dal momento che riconosce repellenti idrosolubili e volatili, elevate pressioni osmotiche ed il tocco leggero.
- la maggior parte degli stimoli chimici idrosolubili sono riconosciuti da più neuroni sensoriali, ma non da tutti; dato che ogni neurone contribuisce al riconoscimento di vari stimoli, si ipotizza che, ogni neurone chemiosensoriale esprima, come nel sistema gustativo dei vertebrati, recettori multipli sulle ciglia sensoriali (Bargmann and Horvitz, 1991; Bargmann et al., 1990).

Le funzioni chemiorecetttrici dei neuroni amfidiali sono schematizzate nella tabella 1:

Chemiorecezione delle molecole volatili

Neurone	Funzione
---------	----------

AWA	diacetile, pirazina, diazolo
-----	------------------------------

AWC	benzaldeide, butanone, alcool isoamilico, tiazolo
-----	---

AWB	evitamento molecole volatili
-----	------------------------------

Chemiorecezione delle molecole idrosolubili

Neurone	Funzione
---------	----------

ASG	feromone dauer (ruolo minore); Na ⁺ ; Cl ⁻ ; cAMP; biotina; lisina (ruolo minore)
-----	---

ASH	evitamento molecole volatili, idrosolubili e elevate pressioni osmotiche; tocco leggero
-----	---

ADF	feromone dauer (ruolo minore) chemiotassi Na ⁺ e Cl ⁻ ; cAMP; biotina; lisina.
-----	--

ASJ	feromone dauer (ripresa)
-----	--------------------------

ASK	chemiotassi lisina; deposizione delle uova
-----	--

ADL	evitamento ottanolo, molecole idrosolubili
-----	--

ASE	chemiotassi Na ⁺ ; Cl ⁻ ; cAMP biotina; lisina; deposizione uova
-----	--

ASI	feromone dauer (ruolo maggiore); chemiotassi Na ⁺ ; Cl ⁻ ; cAMP, biotina, lisina (ruolo minore)
-----	---

Tabella 1: rappresentazione schematica delle principali funzioni dei neuroni chemiosensoriali amfidiali descritti nel testo (Riddle et al. 1997).

Nell' evitamento al chinino tre neuroni amfidiali sono coinvolti (Hilliard et al., 2004), ASH svolge è il principale responsabile; ASK e ADL svolgono un ruolo minore.

I Fasmidi

I fasmidi sono localizzati nella coda, disposti bilateralmente, (fig.19). Ognuno di essi è formato da due neuroni ciliati (PHA e PHB) e da due cellule di supporto, la *sheath* e la *socket*. I neuroni dei fasmidi, come quelli del canale degli amfidi, si allungano fin nel canale della *socket cell*, venendo così in contatto con l'ambiente esterno (Perkins

et al., 1986). Studi recenti hanno dimostrato che i neuroni fasmidici PHA e PHB funzionano come chemiorecettori e modulano negativamente la risposta di evitamento esibita verso le sostanze repellenti; svolgendo una funzione antagonista rispetto ai neuroni amfidiali cefalici (Hilliard et al., 2002b).

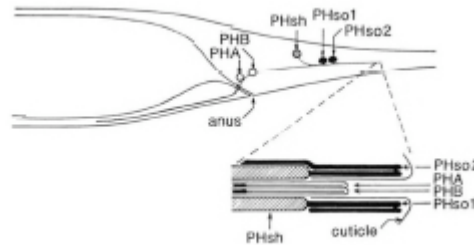


Fig.19 Nei fasmidi si osserva un architettura simile a quella degli amfidi

Differenze tra chemiotassi ed evitamento

La chemiotassi verso i batteri e gli attrattanti idrosolubi avviene in *C. elegans* secondo un processo di integrazione temporale. Gli organi chemiosensoriali sono raggruppati, i segnali esterocettivi vengono integrati temporalmente con quelli propriocettivi. Il processo si realizza lentamente.

Nell'evitamento una mappa chemiosensoriale fig 20 si estende dalla testa alla coda dell'animale. La risposta di evitamento è rapida, ma la risoluzione spaziale è limitata dal numero e dalla locazione degli organi sensoriali. (Hilliard et al., 2002b)

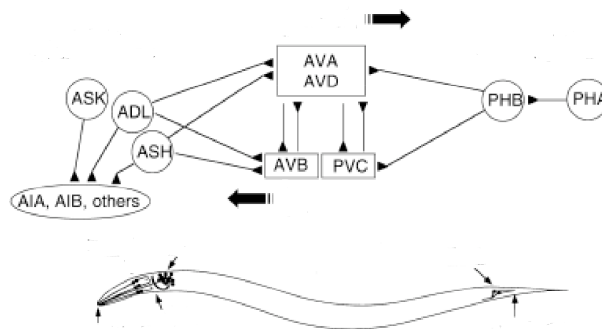


Fig.20 Circuito che media movimento in avanti ed in dietro in *C. elegans*

Approcci tecnici e genetico-molecolari facilitano lo studio di comportamenti indotti da stimoli chemiosensoriali in *C. elegans*

Il DiO

Il DiO Fig.21 è un colorante lipofilico che esposto ai raggi UV produce una fluorescenza verde. Quando *C. elegans* viene lasciato incubare in una soluzione contenente DiO, alcuni dei suoi neuroni sensoriali incorporano il colorante

attraverso le ciglia sensoriali esposte all'esterno e lo trasportano in senso retrogrado ai corpi cellulari. L'incubazione con il DiO colora selettivamente le seguenti cellule neuronali: ASJ, ASH, AWB, ASK, ADL, ASI, (amfidi); PHA, PHB (fasmidi). Attraverso questa procedura vengono discriminati animali con fenotipo selvatico (dyf^+) per le strutture nei neuroni amfidiali e fasmidici, da quelli con fenotipo alterato (dyf^-). Questo colorante offre la possibilità di effettuare una prima caratterizzazione tra animali mutanti che si mostrano incapaci di evitare il chinino. I mutanti comportamentali candidati per avere difetti nella trasduzione del segnale possono essere facilmente separati da quelli che presentano difetti nella morfologia e nella funzionalità delle ciglia sensoriale.

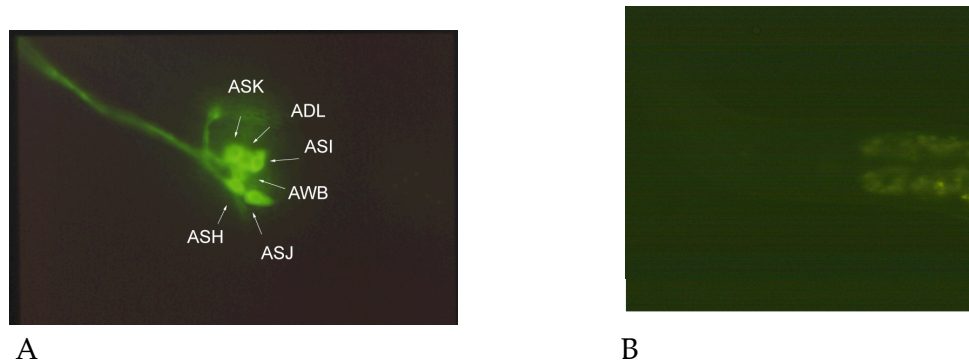


Fig 21 Animali con fenotipo dyf^+ (A) e dyf^- (B)

Costruzione di ceppi transgenici

Approcci genetico-molecolari quali la tecnica di trasformazione ottenuta mediante microiniezione di DNA, (plasmidi-reporters, marcatori fenotipici e promotori cellula specifici e stadio specifici), facilitano gli studi di espressione e sovraespressione dei geni in *C. elegans* e consentono di effettuare esperimenti di recupero del fenotipo. Mediante la costruzione di ceppi transgenici appropriati (che può richiedere anche una sola settimana) è possibile, inoltre, determinare e studiare *in vivo*, la funzione non solo di proteine integre, ma anche di regioni proteiche discrete, di singoli residui aminoacidici appartenenti a proteine modificate *in vitro*.

Camaleon: sensore dell'attività neuronale di ASH

Un approccio genetico - molecolare, permette di studiare, in un animale vivo, la risposta cellulare del neurone ASH, il principale neurone chemiosensoriale coinvolto nel riconoscimento al chinino, indipendentemente da quella delle altre cellule (Hilliard et al., 2005). Il metodo si basa sulla misurazione dei flussi di ioni calcio che si generano in ASH in seguito alla sua stimolazione con chinino o con altri

repellenti. Per visualizzare il flusso di ioni Calcio si utilizza come sensore di la proteina Camaleon, (fig.23) opportunamente ingegnerizzata in modo che la sua espressione sia diretta da un promotore ASH specifico.

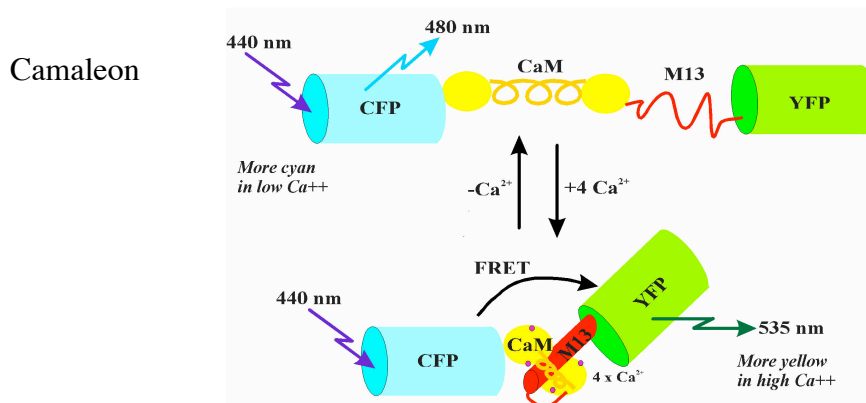


Fig.23 Descrizione rappresentativa del sensore del Ca^{++} Camaleon Da Hilliard et al.; 2005

Camaleon è composta dalla fusione di due Green fluorescent proteins (GFP) ingegnerizzate in modo che una, Cyan fluorescent protein (CFP) è eccitata da luce ad una lunghezza d'onda di 440 nm ed emette a 480 nm, mentre l'altra, Yellow fluorescent protein (YFP) è eccitata a circa 480 ed emette a 535 nm. Le due proteine sono connesse da un frammento contenente un peptide derivato da Calmodulin ed uno da miosina la cui conformazione cambia con la concentrazione di ioni Ca^{++} . Se si eccita con luce a 440 nanometri, quando la concentrazione degli ioni Ca^{++} è bassa si ottiene un'emissione a 480 mentre quando la concentrazione degli ioni Ca^{++} sale il frammento cambia conformazione, le due proteine si avvicinano e si ottiene FRET (fluorescence resonance energy transfer). Parte dell'energia a 480 nm anziché essere emessa è assorbita dalla YFP e si ottiene emissione a 535. Si ha quindi uno spostamento dell'emissione da 480 a 535 nm. Questo spostamento può essere misurato da un microscopio a fluorescenza. Animali da saggiare sono trasformati con il costrutto che contiene il gene che codifica per Camaleon fuso al promotore ASH specifico. Gli animali sono immobilizzati su di un vetrino ed il neurone ASH viene posizionato al centro del campo ottico. L'animale viene stimolato con vari repellenti e l'eventuale flusso di ioni Ca^{++} che deriva dalla stimolazione viene misurato.

Con questo metodo tutti i geni che hanno azione in cellule a valle del neurone sensoriale continueranno a mostrare l'aumento di Ca^{++} anche se non sono in grado di rispondere comportamentalmente nel modo adeguato. Lo stesso avviene per quei geni che pur agendo in ASH funzionano a valle della depolarizzazione. Con questo sistema è possibile analizzare i mutanti e le combinazioni di mutanti più

significative che sono stati individuati con l'analisi comportamentale. I risultati di queste analisi dovrebbero permettere di escludere alcuni componenti, che pur avendo effetto sul comportamento dell'animale, non agiscono nell'attivazione e nella trasduzione del segnale in ASH.

Vantaggi offerti da *C. elegans* nella dissezione di vie di trasduzione del segnale

Banche dati, librerie plasmidiche e collezioni di ceppi mutanti

Negli ultimi anni, dopo il sequenziamento del genoma (Science, 1998), l'analisi genetica in *C. elegans* è stata ulteriormente facilitata dalla disponibilità di approcci sperimentali e di informazioni raccolte sistematicamente in banche dati accessibili (www.wormbase.org). Ogni gene è corredato da dettagliate informazioni relative alla disponibilità di ceppi recanti mutazioni nei geni d'interesse, profili d'espressione, eventuali interazioni genetiche descritte, predizioni relative alle proteine codificate, risultati di RNA interferenza, disponibilità di ceppi mutanti, anticorpi specifici, costrutti disponibili.

Lo studio della funzione di un gene, nota la sequenza e la struttura, è inoltre facilitata sia attraverso lo studio di mutanti nulli transienti, generati attraverso l'interferenza con RNA a doppio filamento che attraverso la ricerca di interattori fisici la tecnica del doppio ibrido in lievito. Sono disponibili librerie plasmidiche contenenti frammenti di tutti i 19000 geni predetti e di ogni cornice di lettura aperto (ORFeoma) del genoma di *C. elegans*, ingegnerizzate rispettivamente per esperimenti di silenziamento genico mediante interferenza con RNA e per studiare interazioni fisiche mediante la tecnica del doppio ibrido.

***C. elegans*: biologia generale, anatomia, genoma e analisi genetica**

Il nematode *Caenorhabditis elegans*, fig. (24) vive, in natura, negli strati superficiali del terreno in molte parti del mondo e si nutre di batteri e di altri microbi. Cresce facilmente in laboratorio su un terreno solido o in liquido, nutrendosi di *E. coli*; può essere congelato; lo sviluppo dall'embrione all'adulto si compie in soli tre giorni (20°), il corpo di dimensioni limitate (1mm), è trasparente e fa sì che divisioni cellulari, migrazioni e differenziamento possano essere studiati *in vivo*, con microscopia ottica ad alta risoluzione.

In *C. elegans* le cellule derivano in modo costante ed invariato dallo zigote e la loro organizzazione spaziale è ampiamente conosciuta. Le 959 cellule somatiche

includono muscoli (111 cellule), neuroni (302 cellule), intestino (34 cellule) e cellule epiteliali (213 cellule). Il sistema nervoso presenta una struttura costante, che è stata dettagliatamente descritta sia a livello di ogni singola cellula che a livello di ogni sinapsi (circa 5000) (White et al., 1987).

Il genoma è costituito da circa 10^8 cb, un contenuto di DNA 20 volte superiore a quello di *E. coli* e pari a circa 1/30 rispetto a quello umano. Si tratta del primo genoma di un organismo pluricellulare completamente sequenziato (Consortium, 1998) e contiene 19000 geni. Il sistema riproduttivo è di tipo ermafrodita autosufficiente, ma l'ermafrodita può incrociarsi con i maschi che vengono generati spontaneamente per un evento di non disgiunzione del cromosoma X che si verifica con una frequenza pari allo 0.7%. In laboratorio, l'autofecondazione degli ermafroditi o l'incrocio con i maschi possono essere manipolati per produrre

progenie con i genotipi desiderati.

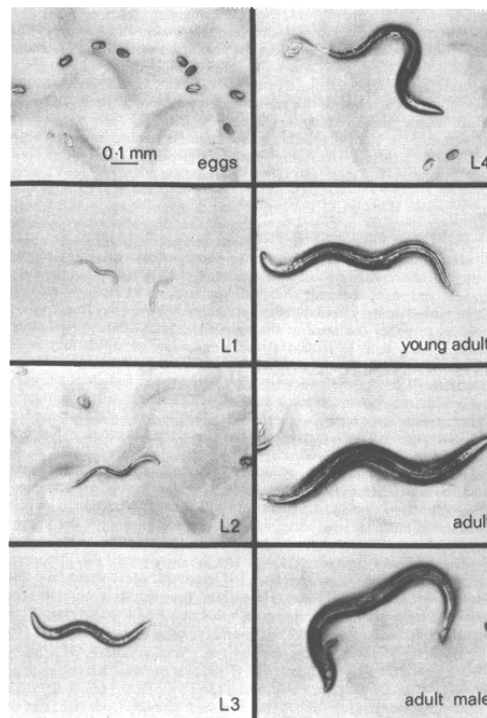


Fig.24 Uova, larve, e adulti di *C. elegans*. Tutte le foto, escluso quella in basso a destra, sono riferite ad ermafroditi. (da *The Nematode Caenorhabditis elegans*, Wood and the community of *C. elegans* researchers, 1988 Cap.1)

Strategia Sperimentale

Per analizzare i componenti molecolari che in *C. elegans* mediano la risposta di evitamento al chinino, l'attività di ricerca è stata condotta seguendo due approcci:

- approccio del miglior candidato;
- nell'ambito dell'identificazione di nuovi geni : studio del gene *qui-1*.

Approccio del miglior candidato

Questo approccio si basa sull'analisi fenotipica (capacità di rispondere o meno al chinino) di mutanti in geni noti, scelti in base alle informazioni disponibili in letteratura sui meccanismi molecolari che mediano la trasduzione sensoriale di segnali chimici. Si propone di indagare sul sistema delle proteine G eterotrimeriche (coinvolte nella percezione di segnali olfattivi e gustativi), su canali ionici, e sul sistema di neurotrasmissione glutaminergica.

Si propone di analizzare animali mutanti per perdita di funzione, che recano informazioni sui geni necessari per sentire il chinino oppure mutanti per aumento di funzione (sovra-espressione), la cui analisi consente di evidenziare funzioni secondarie e anche inibitorie.

Dopo aver individuato i geni coinvolti nel meccanismo di evitamento del chinino si procede all'analisi delle interazioni genetiche. L'analisi del fenotipo di doppi mutanti in geni individuati essere coinvolti nell'evitamento al chinino dovrebbe consentire di ricostruire l'ordine (epistasi) con cui l'azione dei geni analizzati contribuisce alla risposta al chinino.

Per l'analisi della risposta al chinino dei mutanti si sceglie un saggio comportamentale che permette di determinare il fenotipo di singoli vermi (Hilliard et al., 2002a). Questo saggio è rapido e fornisce informazioni sufficienti per le analisi descritte.

Tuttavia la risposta di evitamento al chinino è una risposta comportamentale, la cui complessità risiede nel coinvolgimento di molecole che svolgono funzioni diverse in diverse cellule. Vi partecipano certamente il neurone sensoriale ASH, gli interneuroni su cui ASH fa sinapsi e che dirigono il movimento del verme, i motoneuroni che comandano i muscoli ed i muscoli stessi. Ne deriva che l'analisi della risposta comportamentale consente di identificare i geni necessari all'evitamento, ma analisi più accurate sono necessarie per stabilire in quali cellule detti geni svolgano le specifiche funzioni. Questo fatto può rendere difficile e poco

significativa l'analisi epistatica e di conseguenza portare ad errori nella costruzione della cascata di azione dei geni stessi.

In definitiva l'analisi del comportamento rappresenta solo una fase, preliminare ed esploratoria, finalizzata esclusivamente all'identificazione dei geni coinvolti nell'evitamento al chinino.

Identificata la funzione biologica (risposta al chinino) di un dato gene, l'analisi deve essere indirizzata verso l'identificazione della cellula in cui la funzione genica viene esercitata, la via di trasduzione cui partecipa, eventuali interattori genetici e fisici, fino a stabilire la funzione molecolare: se per esempio si tratti di una funzione effettoria o regolatoria di una data via di trasduzione. Ulteriori indagini, come l'impiego di Camaleon, possono focalizzare l'analisi, a livello dell'attività elettrica di un singolo neurone.

Studio di un nuovo gene, *qui-1*: premessa

Il gene *qui-1* è stato isolato, precedentemente a questo lavoro, nell'ambito di una ricerca finalizzata all'identificazione dei componenti molecolari che mediano la risposta al chinino. In un approccio di genetica diretta, in seguito a mutagenesi chimiche mediante EMS (etil metan sulfonato), sono stati selezionati animali che avevano perso la capacità di evitare il chinino. Un locus genetico, definito *qui-1*, è stato identificato a partire da un gruppo di complementazione costituito da cinque mutanti. Il gene *qui-1*, mappato sul cromosoma IV, è stato descritto costituito da 15 esoni e codificare per una cornice di lettura aperta di 1419 aa. 12 ripetizioni di domini WD-40 venivano individuati nella proteina codificata. Questi domini sono noti per essere coinvolti in interazioni proteina-proteina.

La risposta di evitamento di animali mutanti nel gene *qui-1*, analizzata mediante Drop Test, evidenziava una completa perdita della capacità di evitare il chinino, ed una responsività parziale al glicerolo, al rame ed all'SDS. Questi animali venivano attratti dai batteri.

L'analisi fenotipica nel complesso indica quindi una parziale attività funzionale dei neuroni chemiosensoriali, supportata dal fatto che rimane immutata la capacità di assumere il DiO.

Queste evidenze suggeriscono che il gene *qui-1* sia specificamente coinvolto nella sensibilità chimica non perché partecipa alla costruzione della struttura generale dei neuroni chemiosensoriali, ma perché interviene in qualche processo specifico necessario per la sensibilità chimica.

Non era stata descritta la completa struttura esoni ed introni del gene, né era stato individuato il codone codificante la metionina iniziale. Né ulteriori informazioni erano disponibili per questo gene.

Studio del gene *qui-1*: attività di ricerca

Nello studio del gene *qui-1* l'attività di ricerca è stata condotta al fine di perseguire i seguenti obiettivi:

- completare la struttura esoni-introni del gene;
- descrizione del profilo di espressione;
- identificazione del sito di localizzazione della proteina QUI-1;
- descrizione del neurone sensoriale in cui il gene esercita la sua funzione,
- analisi della sequenza aminoacidica della proteina QUI-1,
- identificazione di eventuali paraloghi in *C. elegans* e di omologhi in altre specie;
- analisi di interazioni genetiche per esplorare la sua funzione molecolare.

Esperimenti di 5' RACE (*Rapid Amplification C-DNA Ends*) e RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerization Chain Reaction*) sono stati delineati al fine di definire la sequenza dell'RNA messaggero del gene *qui-1* e verificare l'esistenza di eventuali trascritti alternativi.

Oligonucleotidi sono stati disegnati nel II putativo esone per la ricerca dell'ATG e lungo tutta la sequenza per la ricerca di eventuali trascritti alternativi.

Per la descrizione del profilo di espressione del gene *qui-1* si è pianificato di analizzare mediante microscopia a contrasto differenziale, animali trasformanti stabili per un costrutto di fusione costituito dalla regione genomica codificante del gene *qui-1* ed il gene reporter *GFP*.

Per definire l'esatta localizzazione della proteina QUI-1 si propone di ottenere un antisiero, generato in seguito ad iniezioni in coniglio, di una proteina QUI-1 ricombinante, espressa in *E.coli*.

Per esplorare la via di trasduzione del segnale cui *qui-1* partecipa, saranno condotti esperimenti di interazione genetica. In particolare si propone di generare animali doppi eterozigoti e doppi mutanti tra il gene *qui-1* e geni dei quali è noto il loro coinvolgimento nella sensibilità al chinino.

Infine si propone di condurre un'analisi dettagliata della composizione in domini presenti nella sequenza aminoacidica dell'estremità amino-terminale della proteina QUI-1, dove non sono stati descritti domini funzionali e si condurrà

l'analisi delle banche dati genomiche, al fine di individuare omologhi del gene *qui-1* nelle altre specie.

Materiali e Metodi

Durante il lavoro sperimentale, descritto nel presente lavoro di dottorato, sono state utilizzate sia tecniche specifiche per lo studio del nematode *C. elegans* con particolare riferimento al manuale: "Methods in Cell Biology", vol.48, 1995, Epstein et al. che tecniche di base di biologia molecolare (Sambrook et al., 1989).

Tecniche specifiche di *C. elegans*

Nematodi

Il ceppo selvatico di *C. elegans* utilizzato è il ceppo Bristol N2. Sono stati inoltre utilizzati i seguenti ceppi mutanti:

NA404 *qui-1 (gb404) IV*; NA 403 *qui-1 (gb-404) IV / dpy-5 (e61) I. gpa-1;gpa-3*; NL335 *gpa-3 (pk35) V*; CX2215 *odr-3(n2150) V*; *goa-1*; KP4 *glr-1(n2461) III*; NL2330 *gpa-13(pk1270) V*; NL 797 *gpa-15(pk477)*; MT6318 *eat-4(n2474) I*; RB660 *arr-1(ok401) X*; JT603 *gpb-2(sa603) I*; CX4544 *ocr-2(ak47) IV*; CX10 *osm-9(ky10) IV*; RB1194 *grk-1(ok1239) X*. DA702 *eat-16 (ad702) I*; MT8504 *egl-10(md176) V*.

I seguenti ceppi sono stati generati in questo lavoro:

NA336 *qui-1(gb404) V*; *him-8(e 1489) IV*; *lin-15(n 765) X*; gbEx123[*gpa-3(FL)::gfp*; *plin-15(+)*]; NA195 *lin-15(n765) X*;gbEx147[*qui-1(+)*; *plin-15*]; NA372 *qui-1 (gb404)*; *lin-15(n765)X*;gbEx142[*psra-6::cDNAqui-1*; *plin-15*]; *qui-1/grk-2*; *qui-1/egl10*; *qui-1/gpa-3*; *qui-1/gpa-3::gfp*, *gpa-1;egl-10*, *gpa-1;qui-1*, *gpa-1; grk-2*, *qui-1*; *lin15*

I vermi sono stati coltivati secondo i metodi standard (Brenner, 1974b). In breve Gli animali vengono cresciuti a $+20^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, su piastre contenenti NGM inseminate con il ceppo OP50 di *E. coli*. La composizione delle piastre NGM è la seguente: 3 g NaCl, 2.5 g Bactopeptone, 20 g Bactoagar in 975 ml di acqua bidistillata, 1 ml Colesterolo (soluzione satura in etanolo 5mg/ml), 1 ml CaCl_2 1 M; 1 ml MgSO_4 1 M; 25 ml NaKPO_4 1 M pH 6.4.

Rimozione di batteri contaminanti.

L'utilizzo di questo protocollo permette di raccogliere un certo numero di uova libere da batteri contaminanti, che alterano la pecezione chimica negli animali e costituiscono un fattore di disturbo nei saggi comportamentali di evitamento.

Si prelevano ermafroditi adulti al cui interno sono visibili le uova non ancora deposte. Gli animali vengono lavati in acqua e poi immersi per alcuni minuti in una soluzione di ipoclorito 2% finale e NaOH 0.5 M. Mentre la cuticola esterna e gran

parte del corpo dell'animale vengono degradati, le uova, che hanno un guscio protettivo, restano intatte. Successivi lavaggi con acqua sterile delle uova così ottenute permette di allontanare la soluzione di ipoclorito e soda. Le uova ottenute vengono piastrate alla densità desiderata su piastre pulite e lasciate schiudere. Gli animali ottenuti saranno liberi da batteri contaminanti e sincroni negli stadi di sviluppo.

Drop Test

Per quantizzare il comportamento di evitamento ai repellenti, nel presente lavoro è stato adottato il *Drop Test* (fig.12) (Hilliard et al., 2002a). Il *Drop Test* è un saggio comportamentale che consiste nel porre una goccia dal volume di circa 5 nl, vicino alla coda di un verme che si muove in avanti: essa per capillarità raggiunge la parte anteriore dell'animale, dove viene a contatto con le ciglia sensoriali degli organi chemiorecettori.

Sostanze repellenti saggiate in questo modo producono nel nematode una risposta di evitamento: l'animale saggiato inverte bruscamente il suo normale movimento sinusoidale in avanti iniziandone uno all'indietro. Viceversa, quando la sostanza depositata non è sentita come repellente l'animale continua il suo movimento in avanti. Ogni risposta di evitamento è registrata entro quattro secondi dalla deposizione della goccia.

Il saggio è stato effettuato con capillari da 10 μ l (Carlo Erba), tirati alla fiamma per ridurne la sezione. La soluzione da saggiare viene aspirata tramite un tubicino (fornito insieme ai capillari) con la bocca o, nel caso di sostanze tossiche, con una siringa da 5 cc. Le piastre NGM da saggio presentano un diametro di 25 mm e sono prive di batteri.

Questo saggio è stato applicato con paradigmi differenti a seconda delle esigenze sperimentali:

- su singolo verme. Per attribuire un fenotipo preciso ad un singolo individuo, ogni animale è stato saggiato con almeno 10 gocce successive con un intervallo tra gli stimoli di almeno 2 minuti (ISI=2 min.). Per descrivere il risultato della caratterizzazione si utilizza l'*Indice di evitamento (I.E.)*, rappresentato dal numero di risposte positive, rispetto al totale delle dieci effettuate, che viene espresso con un valore compreso tra zero e uno.
- su popolazione. Una popolazione può essere caratterizzata saggiando un centinaio di animali con una singola goccia. Per un'analisi più dettagliata di una popolazione abbiamo preferito combinare i due saggi e quindi, per ogni popolazione, sono stati selezionati almeno diciotto animali e ciascuno di essi è stato saggiato con almeno

dieci gocce. Ogni popolazione viene descritta calcolando la media degli *I.E.* ottenuta su 20-30 vermi.

Per indicare la variabilità presente nella popolazione si utilizza la *deviazione standard*:

$$\sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

Per confrontare il comportamento di evitamento di popolazioni di animali appartenenti a ceppi diversi è stato utilizzato il programma "Compare two proportion".

Protocollo di arricchimento per maschi

Negli incroci genetici è necessario l'impiego di maschi, che non sono normalmente presenti in una popolazione di nematodi *C. elegans*, che presenta un sistema di riproduzione di tipo ermafrodita autosufficiente. Per aumentare la frequenza dei maschi si applica un protocollo di arricchimento.

Per ogni ceppo si raccolgono 35-70 larve di ermafroditi di stadio L4, che sono state suddivise in numero di 7/8 su piastre medie con tappeto ed incubate per 6/7 h in un bagnetto termostatico alla temperatura di +30°C. Lo shock termico, determina un aumento della non disgiunzione cromosomica che produce la comparsa di gameti O e quindi del sesso maschile (di genotipo XO).

L'applicazione del protocollo aumenta la frequenza di produzione dei maschi da 0.7% a 2-5%.

Incroci

Gli incroci sono stati eseguiti per generare i ceppi eterozigoti ed i doppi mutanti, utilizzati sia per effettuare le analisi genetiche che per porre geni di interesse in combinazione con un marcatore visibile.

Gli incroci sono stati eseguiti su piastre NGM, dal diametro di 25 mm, inseminate con una goccia di dimensioni ridotte di *E. coli* (OP50). La dimensione della goccia è limitata per favorire l'incontro tra i maschi e l'ermafrodita. Al centro della goccia si pongono i nematodi in rapporto di 5 maschi per ciascun ermafrodita. Gli animali utilizzati per l'incrocio sono allo stadio di giovani adulti.

Poichè gli ermafroditi sono autosufficienti, ci sarà nella piastra di incrocio sia la progenie derivante da autofecondazione sia progenie derivante dall'incrocio con i maschi. Per poter distinguere i due tipi di progenie, è necessario usare un marcatore visibile.

Preparazione ed allestimento dei vetrini per la microscopia ottica

Per l'osservazione microscopica ad alta risoluzione (100 x) si sono utilizzati dei vetrini apposti su cui è stato deposto un cuscinetto di agar al 5%. Per immobilizzare gli animali si utilizza una soluzione di sodio azide 1-10 mM. Su ogni vetrino si pongono i vermi, che vengono poi coperti con un vetrino coprioggetto. Per l'osservazione dei vetrini montati è stato utilizzato un microscopio ad alta risoluzione con ingrandimenti fino a 1000 x, con ottiche Nomarski (a contrasto d'interferenza differenziale) (Zeiss) dotato di fotocamera per le acquisizioni.

Tecniche di Biologia molecolare

Estrazione di DNA genomico

Il DNA genomico del ceppo selvatico è stato estratto con un protocollo che consente di ottenere DNA ad alto peso molecolare, che può essere usato come stampo in reazioni di polimerizzazione a catena che amplificano sequenze di lunghezza pari anche a 20 kb.

I vermi vengono fatti crescere su piastre NGM, lavati in buffer M9 e centrifugati per 1 minuto a 3000 r.p.m al fine di ottenere un pellet di circa 1 ml. Il pellet ottenuto è sottoposto a due lavaggi in buffer M9 ed una volta in NTE (NaCl 100 mM, Tris 50 mM pH=8.3, EDTA 20 mM), che prepara l'ambiente per la fase di digestione con proteinasi K (disciolta nello stesso tampone). I vermi vengono centrifugati (3000 rpm per un minuto), ed il pellet ottenuto, allontanando il surnatante viene congelato in una soluzione di ghiaccio secco/etanolo. La degradazione delle proteine è stata realizzata con una soluzione di Proteinasi K (500 µg/ml) in NTE + S.D.S. 1%. Tale soluzione è stata aggiunta al pellet di vermi congelati, che sono stati incubati per 1 h a +65°C. La miscela è stata suddivisa in aliquote da 500 µl, alle quali è stato aggiunto un ugual volume di fenolo (pH = 7.6). Tale miscela è stata posta su una ruota a velocità minima per 10-15 minuti. Per separare la fase acquosa da quella fenolica la soluzione è stata centrifugata per 7 minuti a temperatura ambiente a 3000 rpm. Con punte blu tagliate all'estremità, per ottenere un diametro maggiore ed evitare la frammentazione del DNA, è stata prelevata la fase acquosa, che è stata poi trasferita in un tubino eppendorf da 1,5 ml. L'estrazione fenolica è ripetuta 3 volte, fino ad ottenere una fase acquosa trasparente. La fase acquosa è stata trasferita in una

provetta di vetro, nella quale sono stati aggiunti 2.5 volumi di etanolo 96-100%, posto precedentemente a -20°C. Il flocculo di acidi nucleici è stato prelevato con un pipetta pasteur a forma di uncino con punta arrotondata, modellata alla fiamma. Il flocculo è stato disciolto in un volume di 400 µl di Tris-HCl 20 mM a pH 8.5, EDTA 1 mM. Il DNA ottenuto può essere usato come stampo in reazioni di polimerizzazione a catena per amplificati da 3-20 kb.

Generazione dei costrutti

I costrutti di fusione sono stati generati secondo le condizioni standard (Hobert et al., (1999).

Promotore qui-1::GFP, che include una regione di 3.5 o 6.8 kb, immediatamente a monte della ORF di *qui-1* (Y45F10B.10) nel cosmide Y45F10B, amplificata con una taq-polimerasi ad alta fedeltà (Long Template Roche) fusa al reporter GFP, amplificato con una taq-polimerasi ad alta fedeltà (High.Fidelity Roche) dal plasmide Ppd95.75; questi costrutti pongono il putativo promotore immediatamente al 5' del gene *GFP*.

qui-1::GFP che include una regione di 19 kb, comprendente, una regione di 6.8 kb, immediatamente a monte della ORF di *qui-1* (Y45F10B.10), l'ORF di *qui-1* (Y45F10B.10) fino al nucleotide precedente al codone di stop, nel cosmide Y45F10B, amplificata con una taq-polimerasi ad alta fedeltà (Long Template Roche), fusa al reporter GFP, amplificato con una taq-polimerasi ad alta fedeltà (High.Fidelity Roche) dal plasmide Ppd95.75; questi costrutti pongono il putativo promotore e la coding sequence immediatamente al 5' del gene *GFP*

La regione regolativa al 5' del gene *qui-1* della lunghezza di circa 6,8 Kb è stata amplificata con i seguenti oligonucleotidi:

129 CCGAAAAACGCCCGTCTCGGAAAAGTTCAC

qui-1rev fus TCTAGAGTCGACCTGCAGGCGAAATTTGATTGGAACGCGAG

Il reporter GFP è stato amplificato dal plasmide 95.75 con i seguenti primers

C GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGG

3'*GFP* AGGTTTTTCACCGTCATCACCGAAACG

Per la fusione sono stati utilizzati i seguenti olinucleotidi:

Y45F10B.10.1-21 ATTCAGGGTCACAACCTCCTTCTTC

D GGAAACAGTTATGTTTGGTATATTGGG

Il costrutto ottenuto contiene il primo esone del gene *qui-1* e le prime 77bp del II esone in fusione traduzionale con la GFP.

La regione regolativa al 5' del gene *qui-1* della lunghezza di circa 3 Kb è stata amplificata con i seguenti oligonucleotidi:

Y45F10B-3933F CAACTCTGCTAACAACCTGTTCCAGTCGCC

qui-1rev fus GGAAACAGTTATGTTTGGTATATTGGG

Per la PCR di fusione sono stati utilizzati i seguenti oligonucleotidi.

Y45F10B-3869F TCC CAC AAC TTG TCC CTT TCC TCT TAC CTG

D GGAAACAGTTATGTTTGGTATATTGGG

Per ottenere il costrutto *qui-1::GFP*, è stato amplificato un primo frammento contenente la regione regolativa al 5' del gene *qui-1* della lunghezza di circa 6,8 Kb e l'ORF di *qui-1* (Y45F10B.10) fino al nucleotide precedente al codone di stop con i seguenti oligonucleotidi:

129 CCGAAAAACGCCCCGTCTCGGAAAAGTTCAC

qui-1 3'GFP TCTAGAGTCGACCTGCAGGCAGCCATTGTAAAACC

Il reporter GFP è stato amplificato dal plasmide 95.75 con i seguenti primers

5'TAA GFP GGTTTTACAATGGCTGCCTGCAGGTCGACTCTAGA

3'GFP AGGTTTTACCGTCATCACCGAAACG

Per la fusione sono stati utilizzati i seguenti oligonucleotidi:

Y45F10B.10.1-21 ATTCAGGGTCACAACCTAACACCTCCTTCTTC

D GGAAACAGTTATGTTTGGTATATTGGG

Il locus *qui-1* è stato amplificato utilizzando la taq Long Template (Roche)gli oligonucleotidi:

Y45F10B.10.1-21 ATTCAGGGTCACAACCTAACACCTCCTTCTTC

Y45F10B(1-21).2 TAAGAACAGTTTTCCGTTGGGGTTTCG

Per le sovraespressioni in ASH è stata utilizzata una regione di 2,8kb situata immediatamente a monte del putativo ATG del gene *sra-6*.

Il locus *egl-10* è stato amplificato come descritto (www.wormbase.org).

Esperimenti di Trasformazione

Gli esperimenti di trasformazione sono stati condotti attraverso l'iniezione di DNA, ottenuto mediante PCR alla concentrazione di 50 ng/ μ l utilizzando il marcatore pJM23 *lin-15* alla concentrazione di 50 ng/ μ l nella gonade di animali adulti con genotipo *lin-15* (*n765ts*). Le linee transgeniche sono state identificate attraverso il recupero del fenotipo multivulva a 20°C degli animali *lin-15*(*n765ts*).

Estrazione di RNA totale

L'RNA totale è stato preparato da una popolazione a stadio misto di animali del ceppo selvaggio N2 mediante un'estrazione con TRI REAGENT (Sigma).

I vermi vengono fatti crescere su piastre NGM, lavati in buffer NTE e centrifugati per 1 minuto a 3000 r.p.m al fine di ottenere un pellet di circa 1 ml. Al pellet

ottenuto è addizionata una soluzione di 3 ml di TRI REAGENT (Sigma) ed il protocollo suggerito dalla ditta è stato seguito.

Preparazione c-DNA

Il c-DNA primo-filamento è stato retro-trascritto dall'RNA totale estratto dal ceppo selvaggio N2, seguendo il protocollo suggerito dalla Superscript III. (Invitrogen).

La preparazione c-DNA con esameri è stata ottenuta utilizzando 6µg RNA totale 50ng di esameri.

La preparazione del c-DNA con oligo dT₁₂₋₁₈ è stata ottenuta utilizzando 5µg RNA totale e (50ng)dT₁₂₋₁₈.

La preparazione c-DNA con primer specifici è stata ottenuta utilizzando 2µg di mRNA e gli oligonucleotidi gene specifico alla concentrazione di [2.5µM] .

Il c-DNA ottenuto è stato utilizzato nelle reazioni di polimerizzazioni a catena utilizzando oligonucleotidi specifici per il gene *qui-1*, come descritto di seguito.

Esperimenti di RACE

Gli esperimenti di RACE sono stati condotti su c-DNA primer-specifico (GPS) per il gene *qui-1*.

Esperimenti finalizzati all'identificazione del 5' del gene è stato preparato un c-DNA *qui-1* specifico con i seguenti oligonucleotidi: Y45F10B.10-18 REV.RACE C C G A C T G T T T T G A T C G T T G ; e R A C E . E X 6 - 3 6 7 8 CGAGTTAGTCCGTGAGATGAAG.

Nella RACE usando SL1 come diretto e come reverse il primer RACE.EX1-996 GTCTCAAGAAAAGCGTTTCGG e nella nested RACE.EX1-918 CGGTGAGACTTGAAGGATTG , è stato individuato un amplificato.

Questo ha consentito l'individuazione di 4 esoni al 5'. In questo trascritto la 5'UTR è costituita da 8 bp (6825-6832 dello YAC Y45F10B); alla posizione 6825 è legato SL1.

Esperimenti finalizzati all'identificazione trascritti corti interni Per individuare trascritti che sarebbero potuti partire dal X esone, data la grandezza del X introne (1079 bp), abbiamo preparato c-DNA *qui-1* specifico con il primer: RACE.EX6-3678 CGAGTTAGTCCGTGAGATGAAG Utilizzando i primers nested: Y45F10B.10-15 ccattccgacaacttcattc, RACE.EX6-3494 GGTCTGAATCGCTGATATTTG, RACE.EX6-3597 ATTCTTCCATCCATTCCTCC, non sono state osservate bande corte.

Questo esperimento è stato ripetuto utilizzando nella preparazione del c-DNA *qui-1* specifico il primer: (RACE EX7 192- rev ATGATGAAGAATCTGTGTTGCG) che si

trova nell' esone XVI. Abbiamo utilizzato nella RACE il primer RACE EX7 113- rev ACATATTCAAAATGGCACAGAG. Utilizzando i primer nested:

RACE EX.7 46- rev ACCATAAAAGCCGTAATCTTCG

RACE EX7 70- rev CATTTCGCTGCCAAAACCATTTGG

non sono state osservate bande corte.

Allo scopo di individuare trascritti corti che potessero contenere soltanto la regione terminale del gene, è stato preparato c-DNA *qui-1* specifico con i seguenti primers:

Race 19342rev TATTCAATTGAAGCACATACAC (3' UTR)

Race19266rev ACATATTTCGATTTTTGTGGTGG (XIX)

E' stato utilizzato nella RACE il primer:

Race18312rev CTTTCGTGGTAGACCATGTCTC (XVIII)

Utilizzando il primer nested :

Race 12716rev TGATCTTCTCAT CCC GAGCACC (XVII)

non sono state osservate bande corte.

Questo esperimento è stato ripetuto utilizzando nella RACE il primer:

Race18338 rev AGCGTTGAAGGTCGAAAGTAGG (XVIII)

Utilizzando i primers nested :

Race18312rev CTTTCGTGGTAGACCATGTCTC (XVIII)

Race 12716rev TGATCTTCTCAT CCC GAGCACC (XVII)

Race 12010rev CCAGCGACATTATTGATAAGAC (XVI)

non sono state osservate bande corte.

Le reazioni di RT-PCR sono state catalizzate dall'enzima Taq polimerasi-Gold (*Applied Biosystems*) seguendo il protocollo suggerito dalla ditta.

Strategia di clonaggio del cDNA del gene *qui-1*

La strategia ha previsto il clonaggio del cDNA con la 3'UTR.

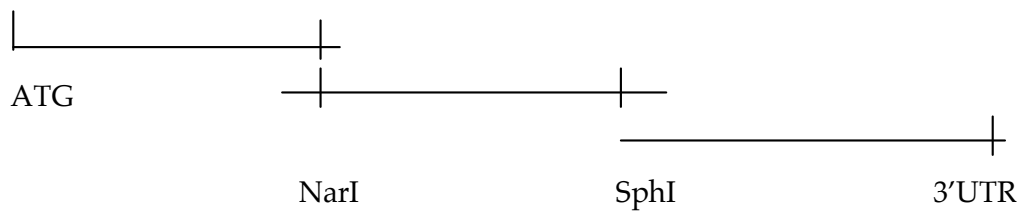
Per il clonaggio è stato scelto il vettore pBSISK+, di cui sono stati scelti i seguenti siti di restrizione del polilinker: SpeI (2231/2232),EagI (2218/2219) e naturalmente assenti nell'inserto. La strategia ha previsto la ripartizione del cDNA del gene *qui-1* in tre frammenti:

Frammento ATG-1598, contenente in posizione 1490 il sito Nar (1528);

Frammento 1390-3604, contenente in posizione 1490 (coordinata dell'intero c-DNA) il sito NarI ed in posizione 3537/3538 il sito SphI (2215);

Frammento 3451-3'UTR contenente in posizione 3537/3538 il sito SphI(1404);.

Gli oligonucleotidi per le amplificazioni (RT-PCR) sono stati disegnati aggiungendo il sito SpeI per l'oligonucleotide diretto ed il sito SpeI per l'oligonucleotide inverso.



La strategia ha previsto :

- l'amplificazione dei singoli frammenti mediante RT-PCR utilizzando una taq ad alta fedeltà (Long Template Roche)
- il clonaggio dei singoli frammenti nei siti SpeI/EagI del vettore pBSIISK;
- il sequenziamento di essi;
- digestione enzimatica successiva

Produzione, purificazione ed esperimenti di immunolocalizzazione dell' anticorpo policlonale specifico anti-QUI-1.

Il c-DNA è stato utilizzato allo scopo di produrre una proteina QUI-1 ricombinante espressa in *E.coli*. Il frammento di proteina è di 367 amino acidi (MW 42278) e con un punto isoelettrico di 6.37.

Questa è stata utilizzata come antigene per immunizzare dei conigli in modo da ottenere anticorpi policlonali specifici. Gli anticorpi anti-QUI-1 sono stati purificati nelle seguenti tappe:

-il siero immune, diluizione 1:200, prelevato dalle cavie è stato dapprima testato per Western Blot, (Maniatis) per verificare la capacità di riconoscere l'antigene utilizzato per le immunizzazioni; l'anticorpo anti – QUI-1-1 funziona diluito 1:500 (SIERO TOTALE PENULTIMA IMMUNIZZAZIONE) testato su 0.5 µg di proteina pura; reagisce con 5, 10, 100µl di coltura indotta e non reagisce con 100µl di coltura indotta di Kal-1. La proteina QUI-1 ricombinante ha un HIS-TAG, clonata in petM11 ed è alta 43kDa. E' espressa in BL-21DE3. MARKER DI SELEZIONE : kanamicina 30 µg/ml

L'induzione funziona sia a 22°C O/N che a 37°C per 2 ore.

-le immunoglobuline totali sono state purificate dal siero mediante cromatografia per affinità (Prot A SIGMA);

-la proteina QUI-1 è stata legata ad una resina derivatizzata con CNBr. Una cromatografia per affinità ha consentito di purificare dalle immunoglobuline totali, gli anticorpi policlonali specifici contro QUI-1.

Esperimenti immunolocalizzazioni

Per immunolocalizzare la proteina QUI-1 in *C. elegans*, colture stadio-misto di animali selvatici mutanti *gb404* sono state preparate utilizzando i metodi descritti da Finney e Ruvkun (1990) e Finney (1991). I vermi cresciuti su piastre NGM-agar inoculati con ceppi di E.Coli OP50, sono state lavate con tampone M9, per eliminare la contaminazione batterica. Il pellet dei vermi lavati sono stati risospesi in un volume di mezzo fissativo di Ruvkun Modificato freddo (80mM KCl, 20mM NaCl, 10mM EGTA, 5mM Spermidina HCl, 15mM Na-Pipes, pH=7,3, 25% metanolo). I vermi sono stati incubati nel fissativo per 20 min in ghiaccio, congelati in una soluzione di ghiaccio secco/etanolo, lasciati a temperatura ambiente per 20 min. I vermi sono stati centrifugati ed il pellet ottenuto è stato lavato con un tampone TTB (100 mM Tris-HCl, pH=7,4, 1% Titon X-100), 1 mM EDTA) e poi incubato con un tampone Tris-Triton/1% β -mercaptoetanolo per 1h a temperatura ambiente per ridurre i ponti disolfuro della cuticola. I vermi sono stati lavati una volta in tampone BB (25mM H₃BO₃, 12,5 mM NaOH, pH 9.2) e poi incubati in 10 mM DTT/BB per 15 min a temperatura ambiente. I vermi così permeabilizzati sono stati lavati una volta in tampone BB e poi incubati in tampone BB/1% H₂O₂ per 15 min a temperatura ambiente per ossidare i gruppi sulfidrilici liberi. L' H₂O₂ è stata lavata via estensivamente con tampone BB, e quindi i vermi processati per l'immunolocalizzazione. I vermi sono stati bloccati per 1 h a temperatura ambiente in tampone PBST-A (1XPBS, 1%BSA, 0,5% Triton X-100, 1mM EDTA, 0,05%NaN₃), contenente siero di capra 10%, sedimentati per gravità e poi incubati per una notte con gli anticorpi anti-QUI-1 diluiti 1:5 in tampone PBST-A. i vermi sono stati lavati per un giorno con tampone PBST-B (1XPBS, 0,1%BSA, 0,5% Triton X-100, 1mM EDTA, 0,05%NaN₃) e quindi incubati con anticorpi anti-coniglio Alexafluor, diluiti 1:200 in PBST-A. Gli anticorpi secondari sono stati preassorbiti su animali fissati, prima dell'immunolocalizzazione.

Software

Per lo svolgimento del presente lavoro sono stati utilizzati diversi strumenti bioinformatici, in particolare i programmi: "DNA Strider 1.2", per l'analisi di sequenze nucleotidiche e aminoacidiche; "Factura 2.0.1", "Inherit Autoassembler 1.4.0" per l'analisi degli elettroferogrammi ottenuti in seguito a reazioni di sequenziamento, il software di gestione FileMaker per la gestione dei ceppi di nematodi, il programma "Blast" per la ricerca degli omologhi del gene *qui-1* nelle altre specie, il pacchetto "Primer of Biostatistics", per le analisi statistiche, Clustal W

, Emboss, SMART, per le analisi degli omologi. Il software di gestione EndNote 5 per l'inserimento delle referenze in questa tesi.

Risultati

Analisi dell'evitamento al chinino di mutanti in geni codificanti i componenti molecolari della via di trasduzione del segnale mediata dalle proteine G eterotrimeriche.

Premessa

C. elegans esibisce chemiotassi positiva verso molecole riconosciute come attrattanti; chemiotassi negativa e comportamenti di evitamento indotti da composti chimici riconosciuti come repellenti. Nel Nematode, oltre che una discriminazione tra neuroni olfattivi (AWA, AWB, AWC) e gustativi, si può generalmente distinguere tra neuroni chemiosensoriali che riconoscono stimoli attrattanti (AWA, AWC, ADF, ASG, ASI,) e neuroni chemiosensoriali che riconoscono stimoli repellenti (AWB, ASH, ADL). Fanno eccezione ASE e ASK che riconoscono sia stimoli attrattanti che repellenti. I sistemi chemiosensoriali di *C. elegans* presentano molti parallelismi con quelli dei mammiferi sia a livello del generale funzionamento delle cellule sensoriali, che nel nematode sono solo neuroni, sia a livello delle molecole coinvolte nella trasduzione sensoriale. In *C. elegans* è stato dimostrato che la percezione di una molecola come attrattante o repellente è determinata dal neurone sensoriale che esprime il recettore specifico di un determinato composto volatile (Troemel et al., 1997). Lo stessa risposta biologica è stata recentemente osservata nel sistema gustativo dei mammiferi dove la percezione del dolce e dell'amaro è mediata da cellule diverse (Mueller et al., 2005). E' interessante notare quanto simile è l'architettura di una gemma gustativa dei mammiferi ed il poro amfidiale di *C. elegans*. **fig25**

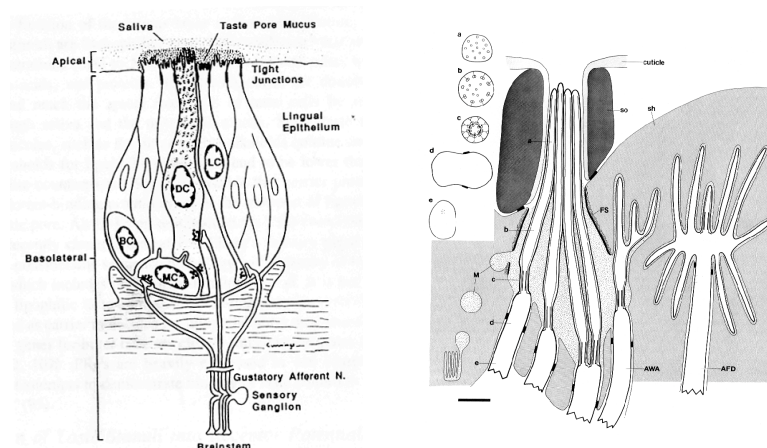


Fig 25. Confronto tra una gemma gustativa di un Mammifero (a) e l'organo

chemiosensoriale principale di *C. elegans* (b). Si noti la sorprendente somiglianza che esiste tra organi analoghi di organismi tanto lontani evolutivamente

E, come nel sistema gustativo dei mammiferi, ogni neurone chemiosensoriale in *C. elegans* esprime e riconosce una varietà di stimoli diversi. (Troemel et al., 1995). Molte evidenze infine, suggeriscono anche in *C. elegans*, la percezione di stimoli chimici, volatili ed idrosolubili, attrattanti e repellenti, è mediata dai recettori a serpentina accoppiati alle proteine G eterotrimeriche.

Il genoma di *C. elegans* codifica per 1000 Candidati chemiorecettori appartenenti alla superfamiglia dei "G protein-coupled Receptors", (Bargmann, 1998) suddivisi in 4 famiglie: 700 *str* (ODR-10 related)/*stl/srd*,; 150 *sra/srb/sre*; 40 *srg*; 80 class A orphan receptors. Componenti addizionali del "G protein signaling" includono 21 subunit G α , (Cuppen, 2003), 2 subunità G β , 2 subunità G γ , (Bargmann, 1998; Jansen et al., 1999a). 12 proteine RGS (Regulators of G protein Signaling", (incluse 2 "GPCR kinase"), 3 adenilato ciclasi, 8 PLC, 4 cGMP PDE, ed 1 singola arrestina (che codifica un' arrestin "non- visual") (Bargmann, 1998; Jansen et al., 1999a).

Tra le subunità G α , quattro presentano una evidente omologia con subunità G α dei mammiferi: G $\alpha_{o/i}$ (*goa-1*), G α_s (*gsa-1*), G α_q (*egl-30*), e G α_{12} (*gpa-12*). Le altre 17 non presentano una evidente omologia. 14 subunità G α sono quasi esclusivamente espresse nei neuroni sensoriali degli amfidi e dei fasmidi. Mutazioni in questi geni non sono essenziali per la vitalità, e solo quattro causano difetti nella percezione chemiosensoriale evidenti, suggerendo estensiva ridondanza funzionale (Jansen et al., 1999a). Per quanto riguarda le subunità G β , queste mostrano espressione ubiquitaria, il mutante *gpb-1* non è vitale, il mutante *gpb-2* non è descritto avere difetti nella chemiorecezione. Per le G gamma *gpc-2* ha espressione ubiquitaria, mentre *gpc-1* ha un'espressione specifica nei neuroni sensoriali (Jansen et al., 2002) e recentemente (Hilliard et al., 2005) è stato dimostrato il suo coinvolgimento nella trasduzione del segnale del chinino. Studi effettuati sul mutante *grk-2* (G-Protein coupled Receptor Kinase) hanno dimostrato che l'attività neuronale di ASH in un nematode vivo, stimolato con chinino è completamente abolita (Fukuto et al., 2004). Per le 21 subunit G α è stato completamente descritto il profilo di espressione.

ADF: *gpa-3, 10, 13, odr-3*

AWA: *gpa-5, 6, odr-3*

ASE: *gpa-3*

AWB: *odr-3*

ASG: *gpa-3*

AWC: *gpa-2, 13, odr-3*

ASI: *gpa-(1), 3, 4, (5), (6), 10, 14*

ASJ: *gpa-1, 3, 9, 10, 14*

ASK: *gpa-2, 3, 14, 15*

ADL: *gpa-1, 3, 11, 15*

ASH: *gpa-1, 3, 11, 13, 14, 15, odr-3*

TAB2. Espressione dei geni codificanti le subunità α delle proteine G (*gpa*) in *C. elegans*.
Molte subunità $G\alpha$ sono espresse nei neuroni chemiosensoriali. (Jansen et al. 1999)

Analisi dei mutanti in geni codificanti i componenti di G Protein Signalling

Per stabilire se tra le subunità $G\alpha$ delle Proteine G eterotrimeriche espresse nel neurone sensoriale ASH, principalmente coinvolto nella sensibilità al chinino, ve ne fosse qualcuna responsabile dell'evitamento del chinino, mediante il Drop Test (Hilliard et al., 2002a) è stato analizzato l'evitamento al chinino dei mutanti in geni codificanti le subunità $G\alpha$ delle Proteine G eterotrimeriche espresse in ASH.

Sono stati analizzati i mutanti nei seguenti geni : *gpa-15*, *gpa-13*, *gpa-1*, *goa-1*, *gpa-3*, *odr-3*. La risposta di evitamento al chinino è significativamente ridotta nel mutante *gpa-3*, ma non nei mutanti *gpa-15*, *gpa-13*, *gpa-1*, *goa-1*, *odr-3* (fig26).

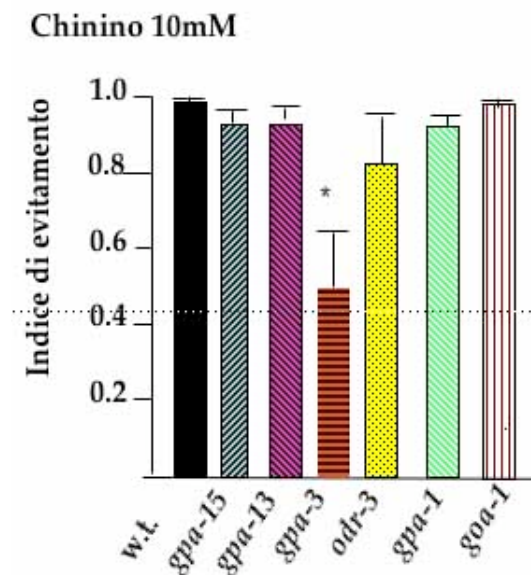


Fig. 26. Risposta di evitamento esibita da mutanti in geni codificanti subunità $G\alpha$ delle Proteine G eterotrimeriche espresse in ASH. Il comportamento di evitamento è stato analizzato mediante il Drop Test. Ogni barra è stata ottenuta su una popolazione di ≥ 10 animali testati ognuno con 10 gocce di chinino [10 mM]. Le barre di errore indicano la deviazione standard . L'asterisco "*" indica una differenza statisticamente significativa rispetto al ceppo di controllo.

Il gene *gpa-3* è espresso anche nei neuroni sensoriali ADF, ASE, ASG, ASI, ASJ e nei neuroni che rivestono un ruolo minore nell'evitamento al chinino ADL e ASK. La proteina GPA-3 è localizzata sulla punta delle ciglia sensoriali, suggerendo una funzione molecolare svolta immediatamente nella via di trasduzione. (Lans et al., 2004; Zwaal et al., 1997).

Tuttavia sebbene ridotta la risposta al chinino dei mutanti *gpa-3* non è completamente abolita. La risposta residua osservata suggerisce l'azione di un'altra subunità $G\alpha$ delle Proteine G eterotrimeriche oppure di altre molecole del segnale sconosciute.

L'analisi comportamentale del doppio mutante *gpa-3;odr-3* evidenzia una risposta a chinino completamente abolita (fig27).

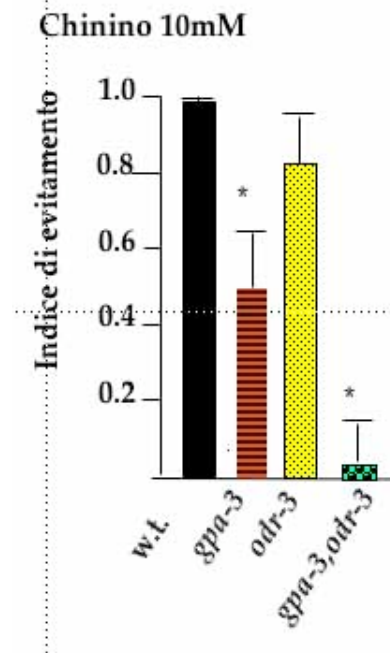


Fig. 27. Risposta di evitamento esibita dai singoli mutanti nei geni (*gpa-3*, *odr-3*) codificanti subunità $G\alpha$ Proteine G eterotrimeriche e dal doppio mutante *gpa-3; odr-3*. Il comportamento di evitamento è stato analizzato mediante il Drop Test. Ogni barra è stata ottenuta su una popolazione di ≥ 10 animali testati ognuno con 10 gocce di chinino [10 mM]. Le barre di errore indicano la deviazione standard. L'asterisco "*" indica una differenza statisticamente significativa rispetto al ceppo di controllo.

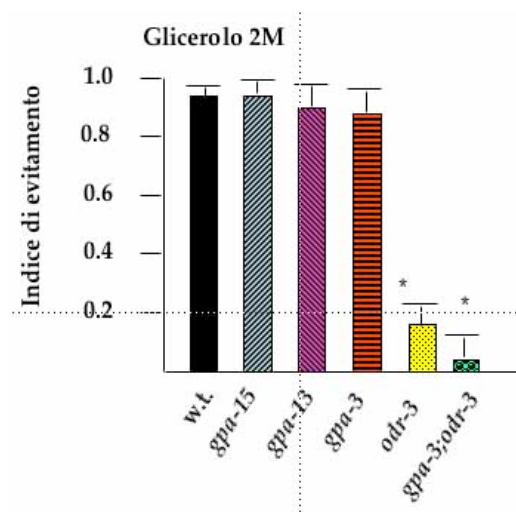


Fig.28 Risposta di evitamento al chinino esibita da mutanti in geni codificanti subunità $G\alpha$ delle Proteine G eterotrimeriche espresse in ASH. Il comportamento di evitamento è

stato analizzato mediante il Drop Test. Ogni barra è stata ottenuta su una popolazione di ≥ 10 animali testati ognuno con 10 gocce di Cu^{++} [10 mM]. Le barre di errore indicano la deviazione standard. L'asterisco "*" indica una differenza statisticamente significativa rispetto al ceppo di controllo

L'effetto della mutazione *gpa-3* sull'evitamento del chinino non è dovuta ad una generale perdita di funzione del neurone ASH, dal momento che i mutanti *gpa-3* sono capaci di rispondere normalmente ad alte pressioni osmotiche.(fig28), Zwaal 1997, (Jansen et al., 1999a).

Una semplice interpretazione di questo risultato suggerisce che la proteina GPA-3 sia il principale componente della trasduzione del segnale del chinino. Allo stato attuale non è possibile stabilire se l'attivazione di GPA-3 avvenga in seguito ad interazione diretta con il chinino o in seguito al legame di esso con un recettore a serpentina.

Inoltre il forte effetto sintenico di *odr-3* e *gpa-3* rivela che ODR-3 è un'altra subunità $G\alpha$ delle Proteine G eterotrimeriche che media l'evitamento al chinino e che il suo ruolo è mascherato dalla presenza di GPA-3. Dal momento che il doppio mutante *gpa-3;odr-3* è ancora capace di rispondere agli ioni rame (fig29), è probabile che altre subunità $G\alpha$ delle Proteine G eterotrimeriche, oltre a GPA-3 e ODR-3 oppure differenti molecole del segnale siano coinvolte nella trasduzione del segnale di altri repellenti.

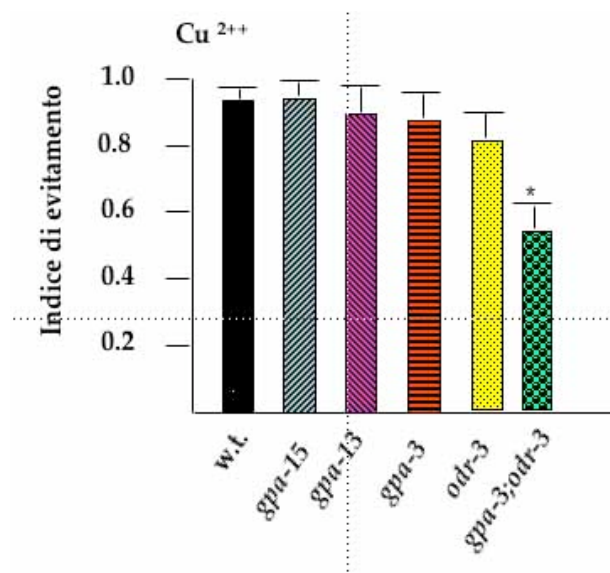


Fig. 29. Risposta di evitamento agli ioni Cu^{++} esibita da mutanti in geni codificanti subunità $G\alpha$ delle Proteine G eterotrimeriche espresse in ASH. Il comportamento di evitamento è stato analizzato mediante il Drop Test. Ogni barra è stata ottenuta su una

popolazione di ≥ 10 animali testati ognuno con 10 gocce di chinino [10 mM]. Le barre di errore indicano la deviazione standard. L'asterisco "*" indica una differenza statisticamente significativa rispetto al ceppo di controllo.

ODR-3 è espressa in cinque coppie di neuroni sensoriali: AWA, AWB, AWC, ASH, e ADF. Quindi, ASH e ADF sono gli unici neuroni in cui entrambe le proteine GPA-3 e ODR-3 sono espresse. E poiché ASH è il solo a cui è stata attribuita una funzione per l'evitamento del chinino è probabile che ODR-3 eserciti la sua funzione in ASH. Infine il fatto che gli animali mutanti nei geni *gpa-3* e *odr-3*, sono portatori di alleli per perdita di funzione, è possibile ipotizzare che le proteine GPA-3 e ODR-3 svolgano un ruolo stimolatorio. Il ruolo svolto è svolto in ASH, come riportato da un lavoro parallelo allo svolgimento da questa tesi (Hilliard et al., 2005).

Per stabilire se esistano subunità $G\alpha$ delle Proteine G eterotrimeriche, che rivestano una funzione inibitoria è stato analizzato l'evitamento al chinino di mutanti per sovraespressione delle subunità $G\alpha$, GPA-1 e GOA-1 descritte svolgere un ruolo inibitorio (Jansen et al., 1999b; Koelle, 2002).

Questi mutanti presentano un comportamento di evitamento al chinino alterato fig.30

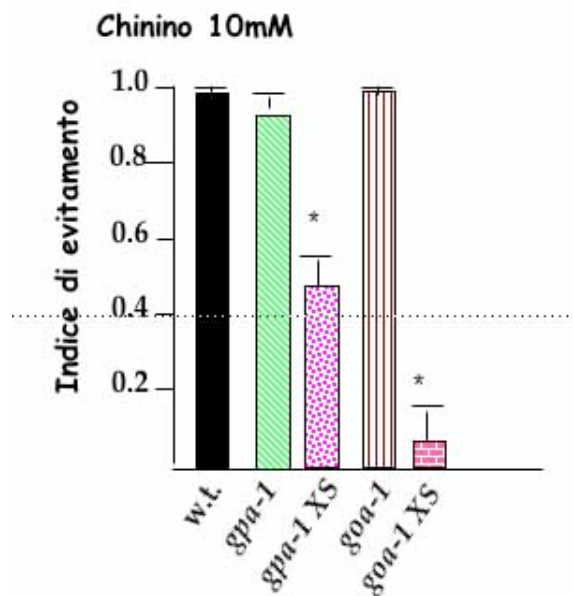


Fig.30 Risposta di evitamento esibita da mutanti per sovraespressione (XS) di geni codificanti subunità $G\alpha$ delle Proteine G eterotrimeriche espresse in ASH. La barra di colore nero indica la deviazione standard. Il comportamento di evitamento è stato analizzato mediante il Drop Test. Ogni barra è stata ottenuta su una popolazione di ≥ 10 animali testati ognuno con 10 gocce di chinino [10 mM]. Le barre di errore indicano la deviazione standard.

L'asterisco "*" indica una differenza statisticamente significativa rispetto al ceppo di controllo

Il gene *gpa-1* è espresso nei neuroni sensoriali ASH, ADL, ASI, PHA ed inoltre nei neuroni maschio specifici SPD SPV SPC ed in alcune cellule della faringe. Il gene *goa-1* è espresso in tutto il sistema nervoso e nei muscoli sesso-specifici. Allo stato attuale non è ancora evidenziato in quale neurone sensoriale GPA-1 e GOA-1 svolgano la loro funzione.

Se i prodotti di questi geni svolgono un'azione inibitoria nel meccanismo molecolare dell'evitamento al chinino allora allora gli alleli per perdita di funzione di questi geni devono sopprimere i difetti provocati dalla perdita di funzione dei geni codificanti le subunità $G\alpha$ che svolgano una funzione stimolatoria. Per confermare il ruolo inibitorio della proteina GPA-1 è stata condotta un'analisi di interazione genetica tra i geni *gpa-3*, *odr-3*, e *gpa-1*. Il triplo mutante *gpa-1;gpa-3;odr3* risponde parzialmente al chinino (AI.=0,55) ed i due singoli doppi mutanti *gpa-1;gpa-3* e *gpa-1;odr-3* rispondono al chinino normalmente. Fig31

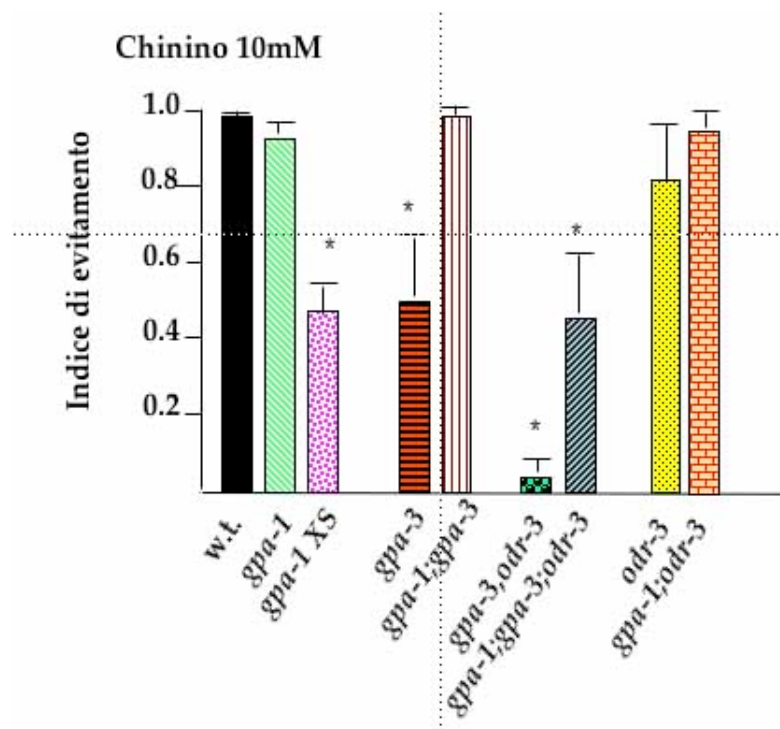


Fig 31 Risposta di evitamento esibita da singoli mutanti per sovraespressione (XS) e da da singoli , doppi e tripli mutanti per perdita di funzione, in geni codificanti subunità $G\alpha$ delle Proteine G eterotrimeriche che svolgono funzioni opposte nell'evitamento al chinino .La barra di colore nero indica la deviazione standard. Il comportamento di evitamento è stato analizzato mediante il Drop Test. Ogni barra è stata ottenuta su una popolazione di ≥ 10 animali testati ognuno con 10 gocce di chinino [10 mM]. Le barre di

errore indicano la deviazione standard . L'asterisco "***" indica una differenza statisticamente significativa rispetto al ceppo di controllo

Questi dati confermano il ruolo inibitorio di *gpa-1* e la risposta parziale del triplo mutante *gpa-1;gpa-3;odr3* suggerisce l'esistenza di un'ulteriore subunità $G\alpha$ stimolatoria (su cui agisce *gpa-1*) coinvolta nell'evitamento del chinino la cui azione viene esercitata non in ASH, dal momento che studi recenti effettuati sul doppio mutante *gpa-3;odr-3*, hanno dimostrato che l'attività neuronale di ASH in un nematode vivo stimolato con chinino è completamente abolita (Hilliard et al., 2005). L'evitamento al chinino è un comportamento complesso in cui agiscono almeno due vie di trasduzione del segnale che generano effetti opposti. Lo stato di "non evitamento" sembra essere associato ad un equilibrio tra queste vie ed il riconoscimento di un segnale esterno, sposta quest'equilibrio. Ma il chinino agisce su una via stimolatoria o inibitoria?

Se è stato dimostrato che il meccanismo di trasduzione del segnale delle proteine G eterotrimeriche agisce nell'evitamento al chinino, allora altri componenti molecolari di questa via di trasduzione del segnale devono essere coinvolti.

Nella ricerca di altri componenti molecolari di questa via coinvolti nell'evitamento al chinino, il primo candidato è rappresentato dal gene *gpb-2*, codificante la subunità $G\beta$ delle proteine G eterotrimeriche. L'analisi comportamentale del mutante nel gene *gpb-2*, non mostra difetti nell'evitamento al chinino. (fig32)

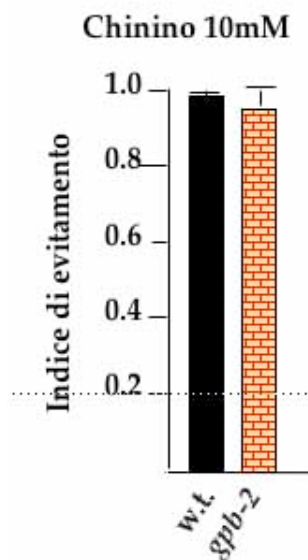


Fig 32 Risposta di evitamento esibita dal mutante nel gene *gpb-2*, codificante la subunità $G\beta$ delle Proteine G eterotrimeriche. La barra di colore nero indica la deviazione standard. Il comportamento di evitamento è stato analizzato mediante il Drop Test. Ogni barra è stata ottenuta su una popolazione di ≥ 10 animali testati ognuno con 10 gocce di chinino [10 mM]. Le barre di errore indicano la deviazione standard.

Probabilmente nell'evitamento al chinino è coinvolta l'altra subunità G β (*gpb-1*) codificata dal genoma di *C. elegans*, il cui mutante, esibendo un fenotipo letale (Jansen et al., 1999b) non può essere analizzato comportamentalmente.

Un'ulteriore analisi molecolare dell'evitamento al chinino è stata condotta su mutanti in geni che codificano componenti regolatori della trasduzione del segnale mediata dalle proteine G eterotrimeriche.

In particolare sono stati analizzati mutanti nei geni *egl-10* e *eat-16*, codificanti proteine contenenti domini RGS (*Regulator G-Protein Signal*) ed il mutante nel gene *arr-1* codificante l'arrestina, descritta nei mammiferi essere coinvolta nel meccanismo di desensitizzazione dei recettori GPCR (Lefkowitz and Shenoy, 2005). Solo il mutante *egl-10* esibisce un grave difetto nella percezione del chinino fig.33

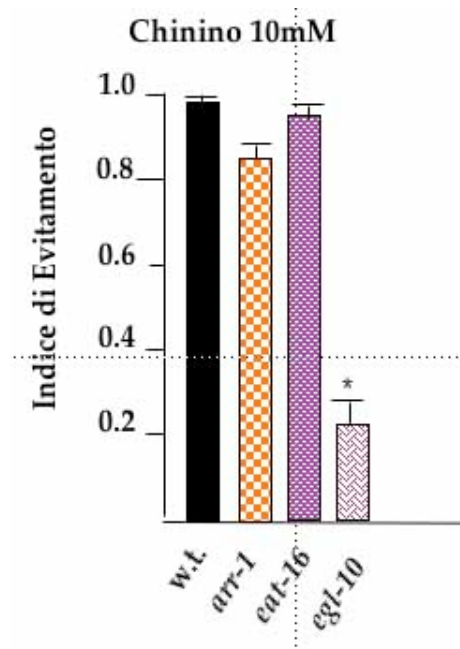


Fig. 33 Risposta di evitamento al chinino esibita da mutanti in geni codificanti proteine con funzione regolatoria del "G Protein signalling". Il comportamento di evitamento è stato analizzato mediante il Drop Test. Ogni barra è stata ottenuta su una popolazione di ≥ 10 animali testati ognuno con 10 gocce di Cu⁺⁺ [10 mM]. Le barre di errore indicano la deviazione standard. L'asterisco "*" indica una differenza statisticamente significativa rispetto al ceppo di controllo.

Il fatto che questo mutante sia in grado di esibire evitamento in risposta al tocco sul naso suggerisce che la proteina EGL-10 non svolga una funzione necessaria per l'apparato locomotorio, ma per la sensibilità chimica. Per esplorare il ruolo della proteina EGL-10 nel neurone sensoriale ASH è stato generato un costrutto di fusione in cui la regione codificante del gene *egl-10* è stato fuso alla regione regolativa al 5'

del gene *sra-6* (codificante un recettore a serpentina), selettivamente espresso in ASH. Gli animali mutanti nel gene *egl-10* trasformati con questo costrutto recuperano completamente la capacità di evitare il chinino.fig. Questo risultato costituisce una forte evidenza del funzionamento della proteina EGL-10 in ASH. Il fatto però che questi animali siano iperattivi e che questo fenotipo non è assegnato al neurone ASH, ulteriori prove devono essere ottenute. Un' ulteriore conferma potrebbe essere ottenuta mediante un secondo costrutto in cui, al promotore ASH specifico del gene *sra-6* sia fusa anziché la regione genomica codificante del gene *egl-10*, la sequenza codificante priva di introni (c-DNA). Per esplorare ulteriori funzioni da assegnare al gene *egl-10* è stato generato un mutante per sovraespressione,fig.34, che non presenta fenotipi evidenti.

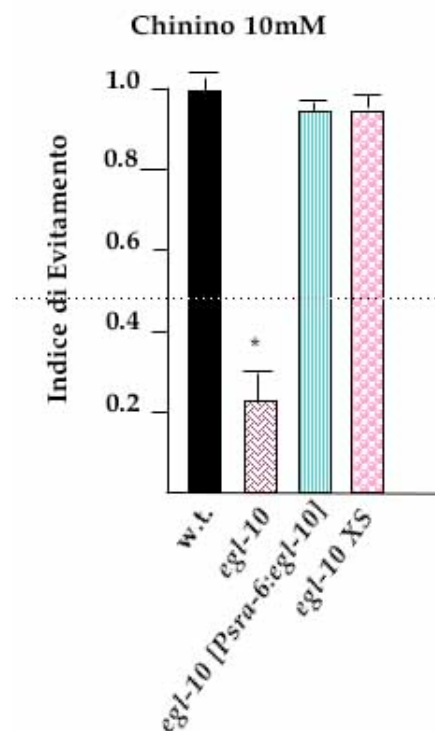


Fig34 Risposta di evitamento al chinino esibita di mutanti nel gene *egl-10*. L'espressione in ASH complementa il mutante per perdita di funzione; il mutante per sovraespressione non presenta difetti. Il comportamento di evitamento è stato analizzato mediante il Drop Test. Ogni barra è stata ottenuta su una popolazione di ≥ 10 animali testati ognuno con 10 gocce di Cu^{++} [10 mM]. Le barre di errore indicano la deviazione standard. L'asterisco "*" indica una differenza statisticamente significativa rispetto al ceppo di controllo.

Nel meccanismo molecolare coinvolto nella deposizione delle uova in *C. elegans* la perdita di funzione del gene *eat-16*, sopprime i difetti generati dalla perdita di funzione di *egl-10* (Koelle, 2002). Questa soppressione si osserva anche nell'evitamento al chinino (fig.35).

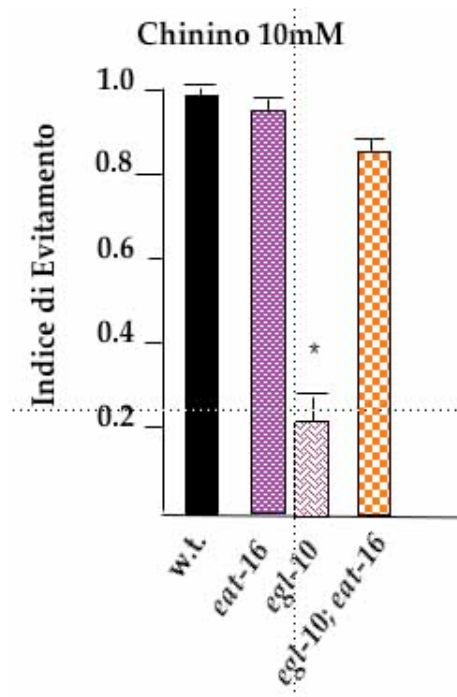


Fig. 35 Analisi dell'interazione genica tra *egl-10* e *eat-16* . Il comportamento di evitamento è stato analizzato mediante il Drop Test. Ogni barra è stata ottenuta su una popolazione di ≥ 10 animali testati ognuno con 10 gocce di Chinino⁺⁺ [10 mM]. Le barre di errore indicano la deviazione standard . L'asterisco "*" indica una differenza statisticamente significativa rispetto al ceppo di controllo.

Questa soppressione non solo conferma la complessità molecolare che sottende al comportamento di evitamento al chinino in *C. elegans*, ma individua nel sistema molecolare *egl-10/eat-16*, nuovi componenti molecolari coinvolti in questo comportamento fig.36.

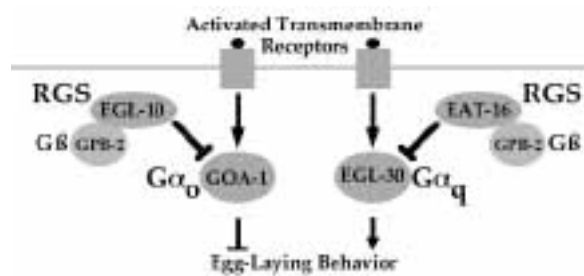


Fig36 Descrizione del sistema molecolare che determina il comportamento di deposizione delle uova in *C. elegans*. La proteina RGS EGL-10 inibisce l'attività della subunità $G\alpha$ GOA-1 che a sua volta inibisce il comportamento in analisi. La proteina RGS EAT-16, inibisce l'attività stimolatoria della proteina EGL-30. Da Patikoglou et al. 2002.

Il comportamento di evitamento al chinino osservato nel mutante *egl-10* , inequivocabilmente inserisce questo sistema molecolare nel meccanismo di evitamento al chinino.(fig.37)

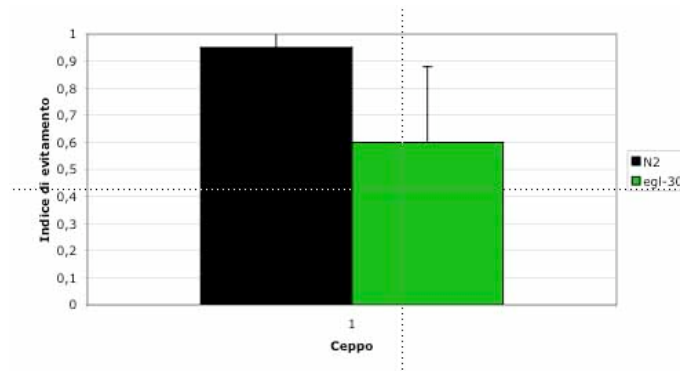


Fig.37 Risposta di evitamento al chinino del mutante *egl-30* . Il comportamento di evitamento è stato analizzato mediante il Drop Test. Ogni barra è stata ottenuta su una popolazione di ≥ 10 animali testati ognuno con 10 gocce di Chinino⁺⁺ [10 mM]. Le barre di errore indicano la deviazione standard . L'asterisco "*" indica una differenza statisticamente significativa rispetto al ceppo di controllo.

Analisi delle interazioni genetiche tra i geni *egl-10*, *gpa-1*, *grk-2*

La proteina RGS EGL-10 svolge funzione inibitoria sulla subunità $G\alpha$ GOA-1 nel sistema dell'"egg-laying", in *C. elegans*. La EGL-10 potrebbe svolgere la stessa funzione inibitoria sia, su GOA-1, che su GPA-1, che sembrano svolgere funzione inibitoria nell'evitamento al chinino. La proteina GRK-2, contiene anch'essa un dominio RGS, ed è stato recentemente dimostrato (Fukuto et al. 2004), che la perdita di funzione nel gene *eat-16*, complementa i difetti generati dalla la perdita di funzione del gene *grk-2*, nella risposta al diacetile. I mutanti dei geni *egl-10* e *grk-2*, sono totalmente difettivi nell'evitamento al chinino. per indagare la possibilità di un ruolo inibitorio svolto dai prodotti proteici dei geni *egl-10* e *grk-2*, è stata indagata l'interazione tra i geni *egl-10*, *grk-2*, *gpa-1*, sono stati generati e analizzati comportamentalmente i doppi mutanti *gpa-1;egl-10*, *gpa-1;grk-2*. La risposta di evitamento al chinino nei doppi mutanti *gpa-1;egl-10*, *gpa-1;grk-2*, è completamente abolita. Il gene *gpa-1* non rappresenta la subunità $G\alpha$ inibitoria su cui agiscono *egl-10* o *grk-2* (fig.38).

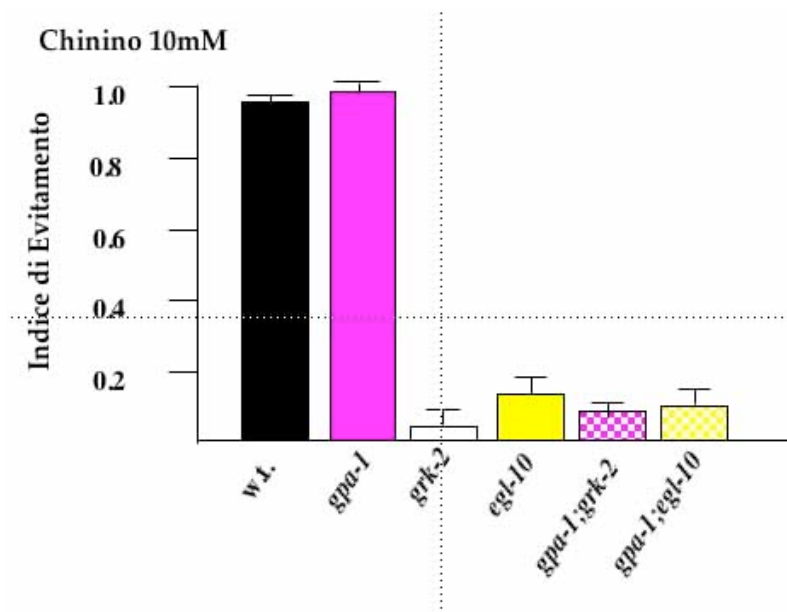


Fig.38 Analisi delle interazioni geniche tra *gpa-1*, *grk-2*, *egl-10*. Il comportamento di evitamento è stato analizzato mediante il Drop Test. Ogni barra è stata ottenuta su una popolazione di ≥ 10 animali testati ognuno con 10 gocce di Chinino⁺⁺ [10 mM]. Le barre di errore indicano la deviazione standard. L'asterisco "***" indica una differenza statisticamente significativa rispetto al ceppo di controllo.

Analisi dell'evitamento al chinino di mutanti in geni espressi in ASH codificanti canali ionici

Nel comportamento di evitamento al chinino sono state individuate in questo lavoro molecole, quali subunità $G\alpha$ GPA-3, ODR-3, che essendo localizzate sulla punta delle ciglia sensoriali del neurone ASH, sembrano agire immediatamente nella via di trasduzione del segnale, in seguito al riconoscimento del chinino. Ma, una volta riconosciuto il chinino, quali canali ionici sono responsabile della depolarizzazione della ciglia sensoriale?

La proteina OSM-9 è un canale selettivo per cationi correlato alla famiglia TRPV (Transient Potential Vanilloid Receptor) espresso in ASH, ASK, ADL e ASE. (Colbert et al., 1997; Tobin et al., 2002). L'evitamento al chinino negli animali mutanti nel gene *osm-9* è significativamente alterata, indicando il coinvolgimento del canale OSM-9 nella risposta al chinino. La presenza di una risposta residua suggerisce il coinvolgimento di altre molecole. Il canale OCR-2, appartiene alla stessa famiglia di OSM-9, ma il mutante del gene *ocr-2*, non esibisce difetti comportamentali (Fig.39). Ulteriori indagini devono essere effettuate per individuare se altri canali concorrano con OSM-9 alla depolarizzazione della ciglia sensoriale conseguente al riconoscimento del chinino.

Analisi dell'evitamento al chinino di mutanti in geni codificanti molecole coinvolte nella neurotrasmissione.

Per stabilire quale neurotrasmettitore trasmette l'informazione chemiosensoriale percepita dal neurone sensoriale ASH all'interneurone comando, che attraverso il motoneurone impartisce l'ordine del movimento all'indietro, l'analisi comportamentale è stata condotta sugli animali mutanti nei geni *eat-4* e *glr-1*, che sono generalmente considerati necessari per l'evitamento per rilasciare il segnale dai neuroni sensoriali agli interneuroni comando. ref La proteina EAT-4 può funzionare come un trasportatore vescicolare del glutammato agendo anche nei neuroni sensoriali ASH e ASK; GLR-1 è un recettore per il glutammato espresso nei motoneuroni e negli interneuroni, inclusi quelli che sono i target sinaptici di ASH. Hart et al 1995. La risposta al chinino dei mutanti nel gene *eat-4* è significativamente ridotta, mentre la risposta osservata nei mutanti *glr-1* è normale (fig38). Questi risultati indicano che la risposta al chinino è almeno parzialmente mediata dal glutammato e che altri recettori del glutammato, indipendenti da GLR-1 debbano essere necessariamente coinvolti nella risposta al chinino.

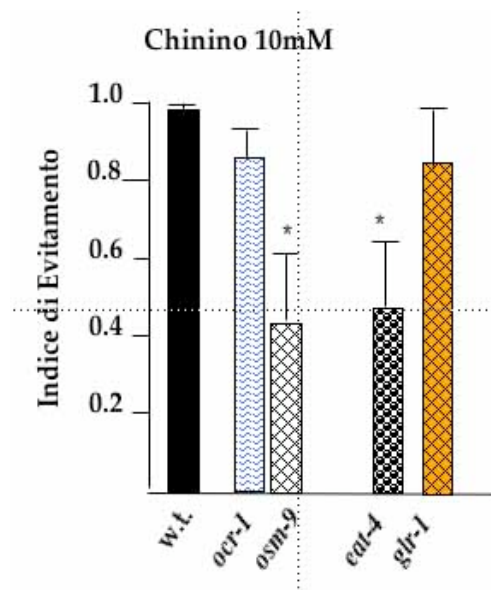


Fig.39 Risposta di evitamento al chinino dei mutanti *osm-9*, *ocr-1*, *eat-4*, *glr-1*. Il comportamento di evitamento è stato analizzato mediante il Drop Test. Ogni barra è stata ottenuta su una popolazione di ≥ 10 animali testati ognuno con 10 gocce di Chinino⁺⁺ [10 mM]. Le barre di errore indicano la deviazione standard. L'asterisco "*" indica una differenza statisticamente significativa rispetto al ceppo di controllo.

Studio del gene *qui-1*: caratterizzazione

La caratterizzazione del gene *qui-1* ha seguito quattro linee di ricerca:

analisi della struttura esoni-introni del gene *qui-1*;

analisi dei siti d'espressione del gene *qui-1*;

analisi della localizzazione cellulare della proteina QUI-1;

analisi della composizione in domini della proteina QUI-1;

Allo scopo di esplorare la funzione molecolare del prodotto proteico codificato dal gene *qui-1* sono stati condotti studi di interazioni genetiche.

Analisi della Struttura esoni-introni del gene *qui-1*

Per stabilire l'organizzazione esoni/introni del gene *qui-1* sono stati analizzati cDNA, ottenuti da esperimenti di RT-PCR e RACE (Rapid Amplification of C-DNA End). Questi esperimenti hanno escluso l'esistenza di trascritti alternativi, individuando un trascritto unico comprendente quattro esoni aggiuntivi all'estremità 5' del gene precedentemente descritto. Il gene *qui-1* comprende 19 esoni e 18 introni, l'ATG corrisponde alla posizione 6833 ed il codone di stop alla posizione 19301 dello YAC Y45F10B. La completa regione codificante dall'ATG al TAA è composta da 12469 bp. L'RNA messaggero maturo parte dalla posizione 6822 della sequenza del cosmide Y45F10B ed è transcribed a SL1, 11 nt precedenti al presuntivo ATG; l'm-RNA è lungo 4868 bp con una cornice di lettura aperta di 1592 aa ed una 3' UTR di 78 nt. (fig.40)

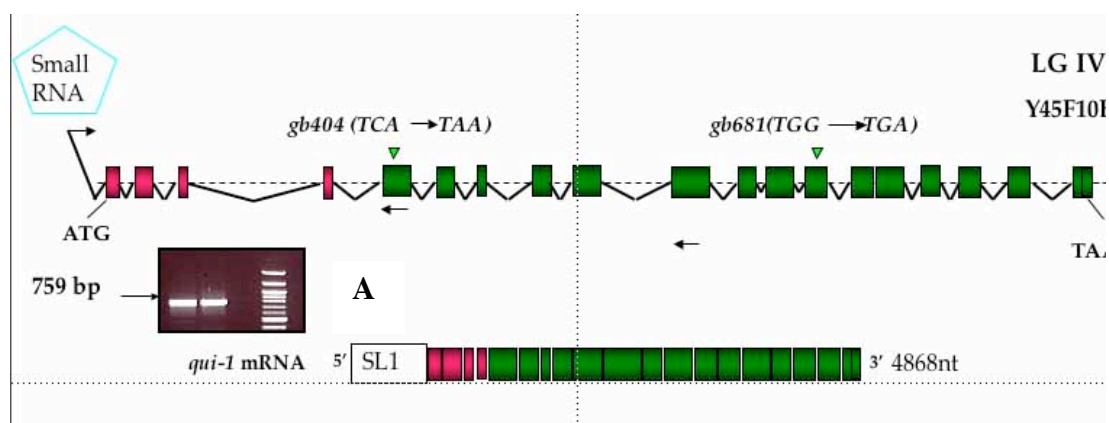


Fig.40 Descrizione del Locus *qui-1*, struttura esoni –introni e dell'RNA messaggero. In rosso i quattro nuovi esoni identificati, mediante 5'RACE. (A).

Analisi del Profilo d'espressione

Allo scopo di individuare i siti di espressione del gene *qui-1*, sono stati prodotti costrutti di fusione del gene *qui-1* al reporter *GFP*. In accordo con i comuni protocolli usati per studi di espressione nel nematode *Caenorhabditis elegans*, sono stati inizialmente generati costrutti di fusione, comprendenti regioni regolative localizzate a monte dell'ATG presuntivo del gene *qui-1*, parte della regione codificante comprendente il primo esone, il primo introne e parte del secondo esone fuso alla cornice di lettura del gene reporter *GFP* (Green Fluorescence Protein).

In particolare sono stati generati un costrutto comprendente circa 3Kb a monte dell'ATG, ed un altro coprendente circa 6Kb a monte dell'ATG. Entambi presentano siti di espressioni parzialmente sovrapponibili (neuroni nell'estremità cefalica, corda ventrale, muscoli, vulva). Il reporter è visibile solo in ADL, neurone che affianca ASH nel riconoscere stimoli repellenti. Non si osserva espressione in ASH, il principale neurone coinvolto nella risposta al chinino, né in ASK, che svolge un ruolo minore. (fig.41A).

Un terzo costrutto di fusione della lunghezza di circa 21kb è stato prodotto, comprendente circa 6kb di regione regolativa a monte dell'ATG e la completa regione codificante posta in frame con la GFP (fig.41B).

Il reporter è visibile nei processi del nerve ring, inclusi i neuroni ASH e ADL, necessari per l'evitamento del chinino. Il reporter è anche espresso in un neurone nel ganglio anteriore, in sette neuroni del ganglio laterale e ventrale, in quattro neuroni addizionali del ganglio retrovescicolare e undici neuroni nel ganglio lombare, PVQ ed il neurone sensoriale PHB.

Questo pattern d'espressione non coincide completamente con quello che si osservava con il costrutto di fusione che mancava di parte del II esone e dei restanti XVII esoni e che non era espresso né ASH, né PHB. Questo indica che importanti elementi regolativi sono presenti lungo la regione codificante del gene *qui-1*. L'espressione del reporter in ASH, il principale neurone chemiosensoriale coinvolto nell'evitamento, appare uniforme nel corpo cellulare, nel nucleo, nel dendrite e nell'assone negli altri neuroni l'espressione della GFP è più bassa in tutti i compartimenti cellulari e apparentemente assente nel nucleo. L'espressione di QUI-1 in ASH e ADL suggerisce che per il suo ruolo nell'evitamento del chinino, funziona in questi neuroni.

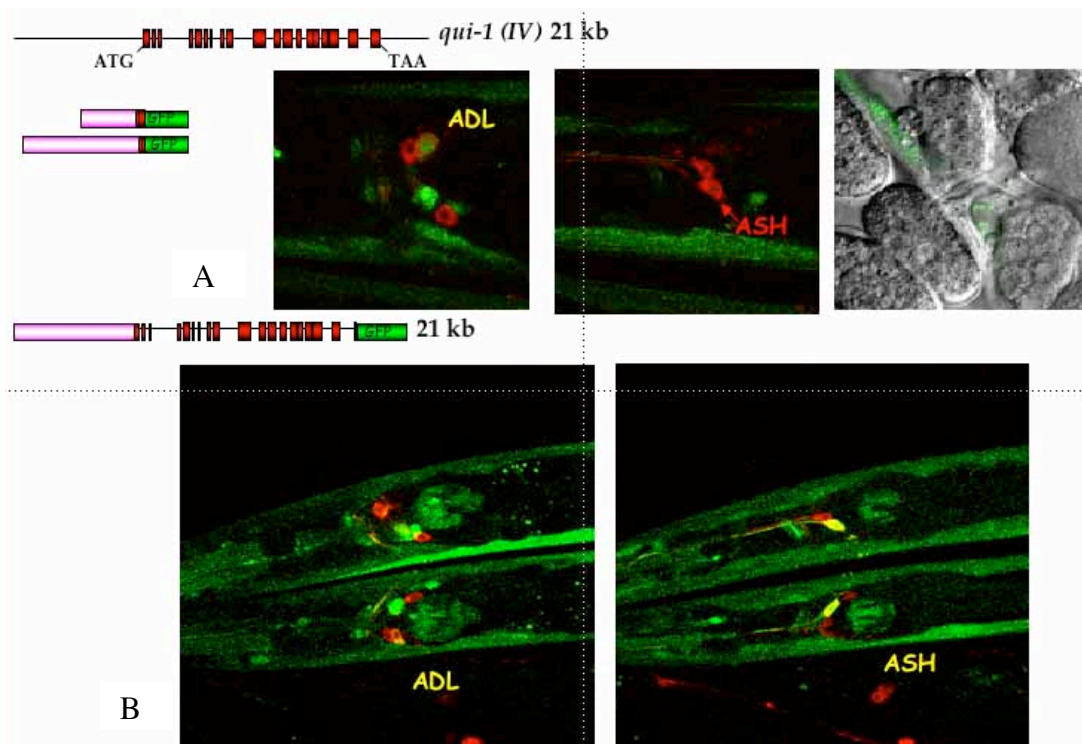


Fig.41 Profilo di espressione del gene *qui-1*. La descrizione è riportata nel testo.
Rosso/DiI; Verde/Reportet GFP; Giallo /colocalizzazione.

Costruzione del c-DNA di *qui-1* e produzione di un anticorpo policlonale anti-QUI-1.

Il cDNA del gene *qui-1* a partire dal codone d'inizio fino al termine della 3' UTR è stato clonato nel vettore pBSISK+. Il c-DNA completo è stato ottenuto mediante una strategia che ha previsto cinque clonaggi successivi. Data la sua lunghezza, il c-DNA è stato suddiviso in tre frammenti che sono stati amplificati mediante RT-PCR con una DNA polimerasi ad alta fedeltà, clonati separatamente e sequenziati. Successivamente i frammenti di c-DNA privi di mutazioni sono stati digeriti e ligati al fine di ottenere il c-DNA completo.

Il c-DNA del gene *qui-1* è stato utilizzato nei seguenti esperimenti: 1) espressione guidata della proteina QUI-1 allo scopo di individuare in quale cellula effettivamente funzioni; 2) produzione di proteina QUI-1 ricombinante espressa in *E. coli*.

Il gene *qui-1* esercita la sua funzione in ASH

Allo scopo di rilevare se la funzione del gene *qui-1* è richiesta in ASH, è stato generato un costrutto in cui il c-DNA del gene *qui-1* è stato fuso alla regione regolativa al 5' del gene *sra-6*, (costrutto *sra-6::qui-1*) selettivamente espresso in ASH. Animali mutanti nel gene *qui-1* sono stati trasformati con il costrutto descritto. Le

linee mutanti nel gene *qui-1*, trasformanti stabili per il costrutto *sra-6::qui-1*, analizzate per l'evitamento al chinino, mostrano un recupero della capacità del 55% di evitare il chinino fig.42

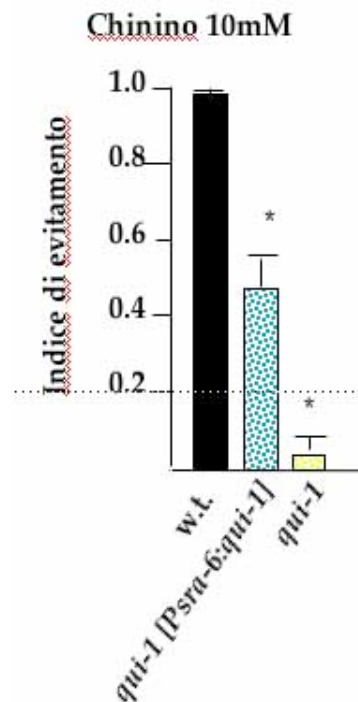


Fig.42 Risposta di evitamento esibita dal ceppo *qui-1(gb404)* transgenico per il costrutto [Psra-6::*qui-1* c-DNA].

Produzione, purificazione ed esperimenti di immunolocalizzazione dell' anticorpo policlonale specifico anti-QUI-1.

Allo scopo di definire in maniera inequivocabile la localizzazione della proteina QUI-1, è stato perseguito l'obiettivo di ottenere un anticorpo specifico verso questa proteina.

Il c-DNA è stato utilizzato allo scopo di produrre una proteina QUI-1 ricombinante in *E.coli*. Questa è stata utilizzata come antigene per immunizzare dei conigli in modo da ottenere anticorpi policlonali specifici. Gli anticorpi anti-QUI-1 sono stati purificati nelle seguenti tappe:

- il siero immune prelevato dalle cavie è stato dapprima testato per Western Blot per verificare la capacità di riconoscere l'antigene utilizzato per le immunizzazioni; le immunoglobuline totali sono state purificate dal siero mediante cromatografia per affinità;(fig.43)

- la proteina QUI-1 è stata legata ad una resina in modo da purificare per affinità dalle immunoglobuline totali, gli anticorpi policlonali specifici contro QUI-1.

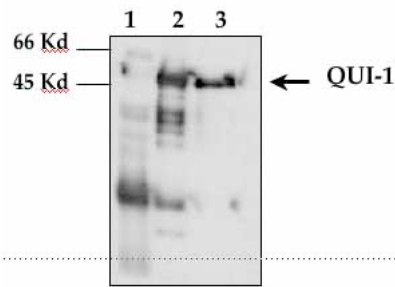


Fig.43 Western Blot. L'anti-siero prelevato dalle cavie immunizzate con la proteina QUI-1 ricombinante riconosce l'antigene utilizzato per le immunizzazioni. 1) 5 μ l di coltura trasformata con pt11QUI-1 non indotta; 2) 5 μ l di coltura trasformata con pt11QUI-1 Indotta; 3) 2.5 ng QUI-1 ric purificata

Esperimenti di immunolocalizzazioni su animali del ceppo selvaggio in toto evidenziano la localizzazione della proteina QUI-1 sulle ciglia sensoriali. Questi siti di localizzazione non si osservano nell'analisi dei mutanti *qui-1(gb404)*.

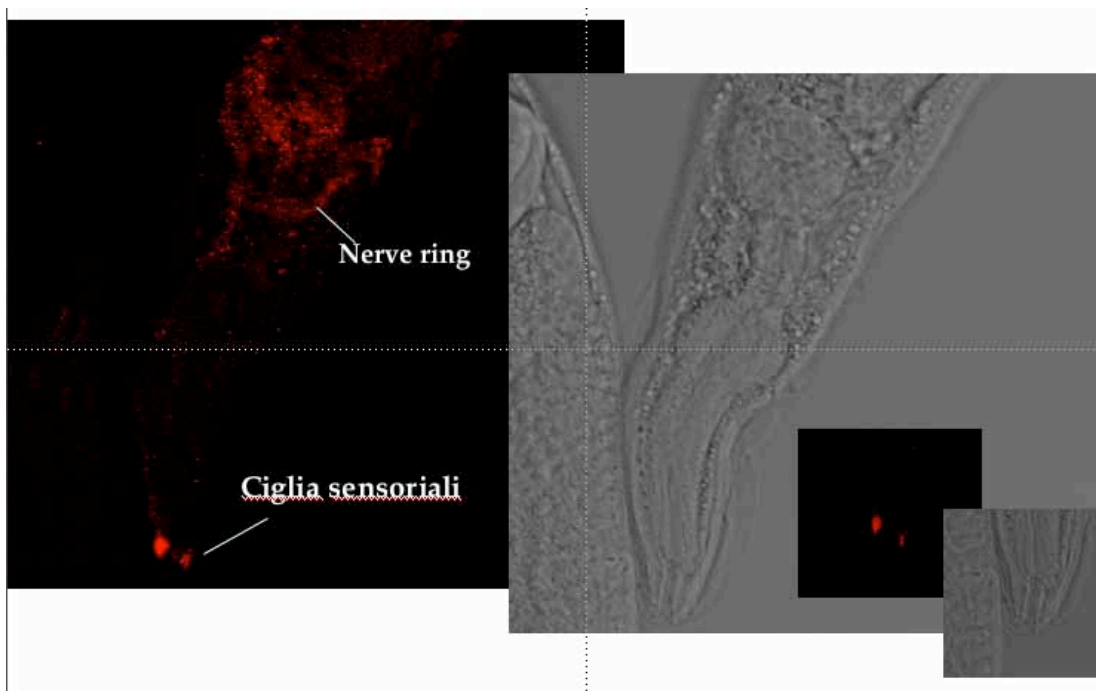


Fig.44 La proteina QUI-1 localizza sulle ciglia sensoriali. Un segnale si osserva anche nel nerve ring, il principale centro di integrazione dei neuroni di *C. elegans*

Analisi della sequenza aminoacidica della proteina QUI-1

L'organizzazione in domini della proteina QUI-1 è stata analizzata mediante l'impiego combinato di programmi di analisi in domini (Prosite e SMART), programmi di allineamento locale (tblastn) ed allineamento multiplo (Clustalw e Multalin). La proteina QUI-1 si caratterizza per la presenza nell'estremità ammino-terminale di un di un dominio RGS, (Regulator G Protein Signalling) fig e di un sito

(P-loop) che lega nucleotidi (GTP o ATP), che fa parte di un dominio proteico di recente identificazione (Konrad et al. 2000), il NACHT. Nella estremità carbossiterminale è localizzata una regione ricca di domini WD-40 (il programma SMART, ne riconosce fino a 12). Questo motivo è tipico di interazioni proteina-proteina.

```

GRK-2      KFDKIFNQKLGFL--LKDYAENVSESPCPQIKFYEA--KEYEKMETPDERLTKAREI--YDHHI 60
EGL-10     SFEEELLADSLGRET--LQKFLD--KEYSGENLRFWVEVQKLR--KCSSR--MVFVMVTEI--YNEFI 57
QUI-1      KFDQLVADPNPNAFLETN--DQNSRKI--EDLKNEITL--KMNDRVMTHTVLRLPE--STDINY--FFN 58

GRK -2      MVEMLAAHNNYS--KESLQHVQY--HLLKQNVPPDLFHRVLE--ICDQLRGDIFORFLESDFKTR 121
EGL-10     DTNAATSPVNVDCVM--E--VTEDNLKNPNRWS--FDEAADH--IYCLMKNDSYORFLRSEIYKD 11
QUI-1      SRDGDKYREKIA--RQFNEKLKN--HLADIN--PEVRPEPPKSPMVLAAANEARTHQEFLENQIALG 111

GRK-2      FC 122
EGL-10     LV 117
QUI-1      NL 120

```

Fig.45 Allineamento dei domini RGS contenuti nelle proteine GRK-2 e EGL-10 e della sequenza omologa identificata nella sequenza proteica codificata dal gene *qui-1*.

Motif I - P-loop			Motif II			Motif III - Mg2+-binding		
TP1_Hs_11161	RLSLVITQSGGKTAFLASLVSA	7	VAPLVFFHFGSAR----	PDQGLALTLLRLC	21	WELQQLLLPKSAESLHPG----	QTQVLIIIGAKRL	60
TP1_Rr_1175	RLSLVITQSGGKTAFLASLVSA	7	VAPLVFFHFGSAR----	PDQGLALTLLRLC	21	WELQQLLLPKSAESLHPG----	QTQVLIIIGAKRL	60
T05C3_2_1030	LPILQSGGKTAFLASLVSA	10	VVLLRFLGTSPDS----	SNIAPLTSTVCDQI	12	PTLSKLQHFHKITNLATREKPLVLIIFSLDEL		
HET-E-1_294	RLILNINSGGKTAFLASLVSA	6	GLLSFFFTQATDSRINNATAVLRLGLIYLLVQQ	28	CEIFTSILQDPLG----	RMTYLIIDALDRC		
CARD4_Hs_196	ETIFILQSGGKTAFLASLVSA	7	GKVFHFFHFCRMFSCFR--	ESDRLCLQDILLKHY	7	EEVFAFLRPF-----	HVALTFPLGLDEL	
CIITA_Hs_414	RVLIAVLRQSGKTAFLASLVSA	8	DFVFSVFCCLNRP----	GDAYGLQDILLFSLG	7	DEVFSHILRPF-----	DRVLLILAFDEL	
NAIP_Hs_464	SVMKVSESGGKTAFLASLVSA	9	RFQILVYLLSSTR----	PDGLASIIICQL	8	EMCMRHILQQLK----	HQVFLILLDYKDI	
Cos1_4_Ci_64	NTVNVVPSGGKTAFLASLVSA	7	DTEYIFFIYAKDID----	FNKEMTLEFLTNS	10	SKALITFLHNN-----	PNVAIFPLGLDEA	
Cos1_5_Ci_82	NTVNVVPSGGKTAFLASLVSA	7	DTEYIFFIYAKDID----	FNKEMTLEFLTNS	10	SKALITFLHNN-----	PNVAIFPLGLDEA	
KIAA0926_Hs_328	RVTLQGAAGSGKTAFLASLVSA	8	RFQHVFFPSCRELA----	QSKVSLAELIGDG	3	PAPIRQLSRP-----	ERLIFILQGVDEP	
SCE94_21_Scoe_254	DRVLLQGAAGSGKTAFLASLVSA	5	RVFPVLPVPRFARG----	FPAPDDFLRAVHPL	5	EGWVVRITLA-----	GRALLVGLIDEA	
SCE94_20_Scoe_263	DQVFLRQVAGSGKTAFLASLVSA	14	RVFPVLPVPRFARG----	FPAPDDFLRAVHPL	5	EGWVVRITLA-----	GRALLVGLIDEA	
SCE94_23_Scoe_267	DRVLLQGAAGSGKTAFLASLVSA	5	RVFPVLPVPRFARG----	FPAPDDFLRAVHPL	5	EGWVVRITLA-----	GRALLVGLIDEA	
sl10068_Sap_133	KYLAVLRQSGKTAFLASLVSA	10	CLPIMENPERKHSRSHDYLFGFWLQAMALEE	4	ATWRDRLILGLQT----	QSWNLVLLGLDIT		
qui-1_347	RGVFLIQSGKTAFLASLVSA	5	DYKVIFFTNLTYS----	SNFAHEANRTIC	13	VLERHFLGLGILKSLLELVQKADKPCVIFIDOVHLL		
XP211460.2-320	TPVLVPSGGKTAFLASLVSA	8	VTVRLRLGTSGMS----	SDARGILKSCIFQV	13	LDANTHVVQFFTLTLHTVSCNPFESLVLLDAMDS		

Motif IV			Motif V			Motif VI			Motif VII		
TP1_Hs_4	GQLISDWIPKK-LPRCHVLVLSVSD	53	LVKRESGRS--LYRLV--DHLRL	129	YGRKRGLEDTAHILIAA	29	LQSGNRLGLSKFTLNLHVVA	156			
TP1_Rr_4	GQLISDWIPKK-LPRCHVLVLSVSD	53	LVKRESGRS--LYRLV--DHLRL	129	YGRKRGLEDTAHILIAA	29	LQSGNRLGLSKFTLNLHVVA	156			
T05C3_2_Co_4	GAHLLWFPPS-LPPFVLFASLTFG	53	KALDKCTLS--LEVLLIYATVAR	91	LPGLYSERAADGVVLN	19	HLETCHSAMAYFLVGVGGV	138			
HET-E-1_Pa_4	PQLLELITRTSCTSPPIKIVSRHW	56	YHSHANGT-FLNVALV--QALAD	74	LEEIVKLCGSFLIIRER	0	TVYFVHQSAKFFLTASDK	62			
CARD4_Hs_21	LVLLANLESGLKLR-GSKLLTARTG	47	NCSLCSVFLPCWIIIP--PQHFR	79	ASGLQERDMQLGLRAL	10	SYEFFRLTQAPFFAFVLV	53			
CIITA_Hs_21	WGLIACLFQKKLRA-QTELLTARFR	52	LILLSHBS--TLCRAV--QLSEA	58	SADVRTWAMAKGLVQHP	6	ELAPFFSLQCLSLALAL	72			
NAIP_Hs_3	PQVIGKLLQKHNL-SKCLLIARTN	49	SLQIKQKT--LEVAAL--AHNFQ	60	AGVDEDEDLTMCLMSKF	7	FYRFLSPAFQEFLLAMRLIE	75			
Cos1_4_Ci_20	VDIMKNLNLTLTP-KAKIVVTSTLD	48	NLAHLCLYL--INFILIV--LLSNE	75	TYVDISSGIRIKILEGN	1	RSYFTHILNQEFYAVVYLM	40			
Cos1_5_Ci_20	VDIMKNLNLTLTP-KAKIVVTSTLD	48	NLAHLCLYL--INFILIV--LLSNE	75	TYVDISSGIRIKILEGN	1	RSYFTHILNQEFYAVVYLM	40			
KIAA0926_Hs_21	DALLGSLGKTLTP-EASFLITART	50	ELWALCLVL--WVSWLA--TCLMQ	64	DGAIISTFLKMGILQEH	4	SYSFILHLCQEFYAVVYLM	63			
SCE94_21_Scoe_8	RDRIIRRLRV--FS--GGGCVTFRS	77	ELRGLATN--LMCGSL--ALNRD	87	AKIFPHILHRTGILLER	3	SVDFVHRTFQOYLAKRIVA	59			
SCE94_20_Scoe_8	RWRRLRVRVA--FP--GRLMVTFRS	54	ELRGLATN--LMCGSL--ALNRD	85	ERVVRAILLRSGLLRP	3	RVDPLRHTFQOYLAKRIVA	59			
SCE94_23_Scoe_8	RDMLGLVRA--FP--GRLMVTFRS	53	DIARLATN--LMCGSL--ALHRE	84	ATVLRALVLRSGILRRP	3	SLDFVHRTFQOYLAKRIVA	59			
sl10068_Sap_13	LTVLKSLAE--VP--TFVLLSRRFD	65	YLRPYLLAR--RLALMC--RFWAD	78	ALQLGLWLPKTAVRKGV	3	GYGFADTFQOYLAKRIVA	46			
QUI-1_2	HLLSQIGRRTEAFDNLSTMTSSRV	47	NEQISAIRS--LMAKDGILIAK	72	LGPIRLKVIIDDRQII	25	HQLSLDFADLLIDNEQSPR	70			
XP211460.2-2	HARRVPWLPLNCPFRVHLILACSG	53	ASLPECGNS--GRILAFTEARK	92	LGYYLARRPVDCFTLLA	18	RAKR--HGVLADEFSTWSQGT	67			

Fig.46 Allineamento che ha consentito l'individuazione del dominio NACHT nella sequenza proteica codificata dal gene *qui-1*.

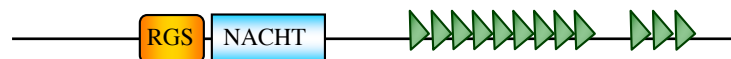


Fig.47 Rappresentazione dell'organizzazione in domini presenti nella sequenza proteica codificata dal gene *qui-1*

Individuazione di omologhi del gene *qui-1* in altre specie

Per identificare geni omologhi di *qui-1* in altre specie è stata utilizzata come “sonda” un frammento contenente i primi 872 aa della proteina QUI-1. Tale frammento è stato sottoposto ad analisi mediante i softwares tblastn e blastP.

Questa analisi ha consentito l'individuazione degli omologhi descritti in tabella3. Il genoma di *Caenorhabditis elegans* codifica per un'altra proteina T05C3.1, la cui sequenza primaria è significativamente correlata a QUI-1 (I=44%). Proteine con sequenza correlata per tutta la lunghezza sono rintracciabili in insetti e mammiferi compreso l'uomo.

<i>Homo sapiens</i>	XP_211460.2
	XP_049078.3
<i>Mus Musculus</i>	NP_795914.1
	XP_132047.3
<i>D.melanogaster</i>	NP_611338.1
	NP_650521.1
<i>A. gambia</i>	XP_314366.1
	XP_309486.1
<i>C.elegans</i>	Y45F10B.10 (qui-1)
	T05C3.2

Tabella 3 Identificativi delle sequenze omologhe al gene *qui-1* rintracciate nelle banche dati genomiche.

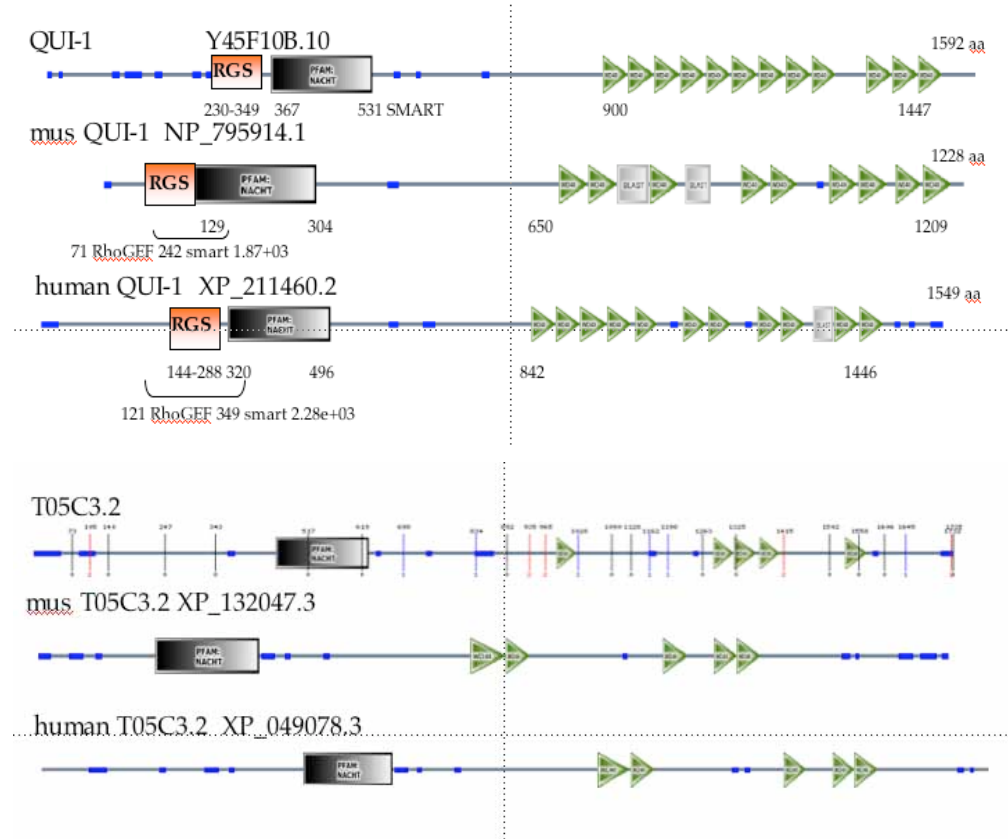


Fig.48 Rappresentazione della nuova famiglia proteica il cui capostipite è QUI-1.

Analisi di RNAi di TO5C3.2

Per esplorare se la funzione biologica del gene TO5C3.2 sono stati condotti esperimenti di RNAi, ma gli animali in cui è stato generato un silenziamento epistatico del gene non presentano alterazioni nell'evitamento al chinino (Fig.49)

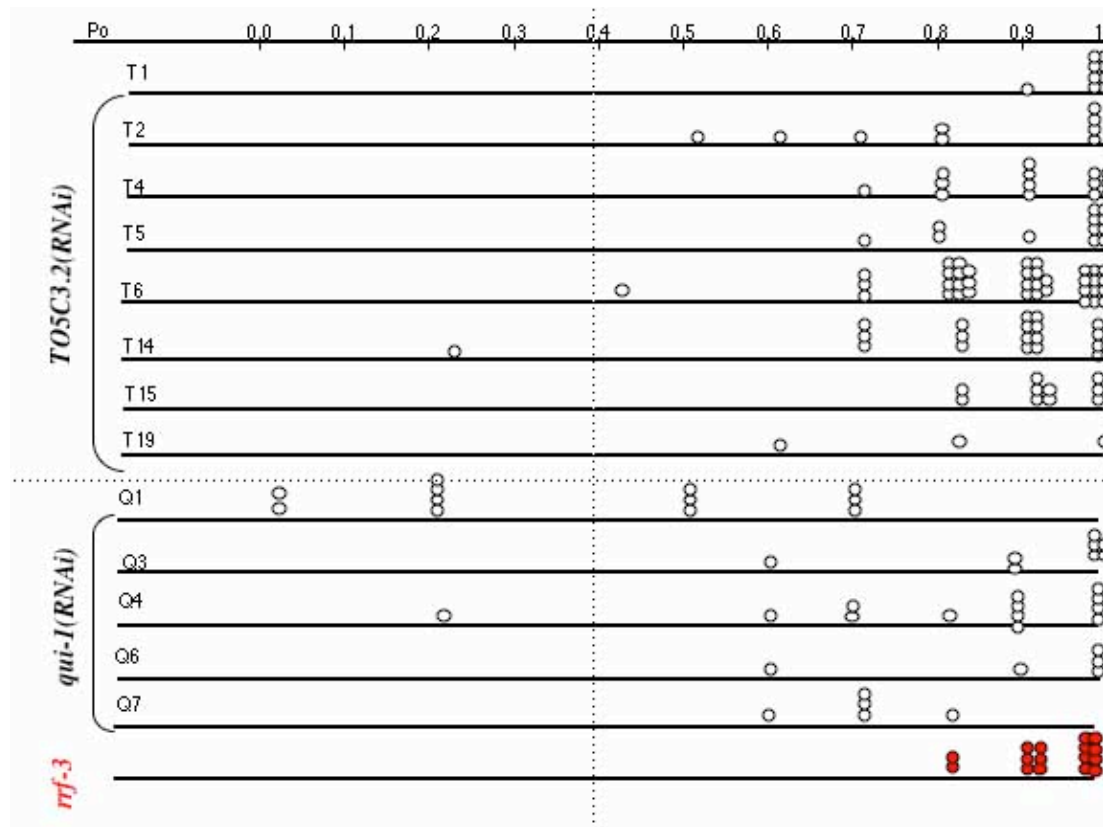


Fig.49 RNAi del gene TO5C3.2 e del gene *qui-1* . Ogni cerchietto rappresenta un animale saggiato con 10 gocce di chinino [10 mM] di generazione F1, derivante da una madre interferita (Po). *rrf-3* è il ceppo in cui è stata eseguita l'interferenza.

Studio della funzione di QUI-1

Analisi comportamentali di linee sovraesprimenti il gene sia in maniera generalizzata che selettivamente in ASH.

Per indagare la funzione del gene *qui-1*, sono state generate linee transgeniche trasformante stabilmente con un costrutto di 21 Kb contenente la regione regolativa al 5' del gene e la regione codificante. E' stato analizzato il comportamento di evitamento di questi animali, per stabilire se fossero ipersensibili al chinino rispetto al controllo. Sono state testate concentrazioni diverse di chinino (0,1mM, 0,5mM, 1mM, 10 mM) Non sono state osservate differenze rispetto al controllo.

Lo stesso esperimento è stato condotto su linee transgeniche trasformate stabilmente con un costrutto in cui la sequenza codificante del gene è stata fusa ad un promotore selettivo per l'espressione in ASH. Anche in questo caso non sono state osservate differenze rispetto al controllo.

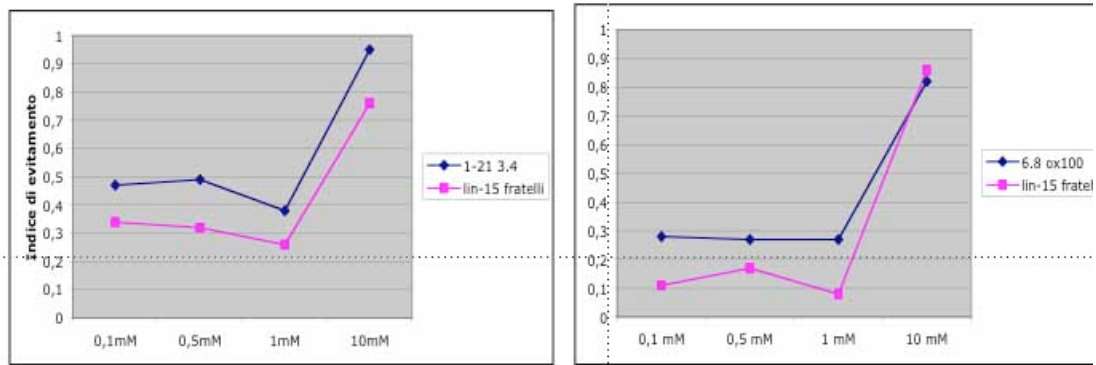


Fig.50 Risposte di evitamento di linee sovraesprimenti il gene *qui-1* esibite a concentrazioni decrescenti di chinino. Ogni punto rappresenta una popolazione di 30 animali saggiati con 100 gocce.

Studio della funzione di QUI-1: analisi di interazioni genetiche

Analisi dell'evitamento al chinino di animali doppi eterozigoti per il gene *qui-1* e per geni coinvolti in importanti processi chemiorecettivi (formazione di ciglia sensoriale e trasduzione del segnale)

L'assenza di segnali di determinazione nucleare o citoplasmatica caratterizza la proteina QUI-1 come un fattore citoplasmatico. La presenza di un dominio correlato RGS collocherebbe QUI-1 all'interno della via di trasduzione del segnale mediato dalle proteine G eterotrimeriche. La localizzazione della proteina QUI-1 sulle ciglia sensoriale, colloca l'attività funzionale questa proteina circoscritta a questo compartimento cellulare.

Per esplorare la funzione molecolare della proteina QUI-1 è stato adottato un approccio basato sull'analisi, delle interazioni genetiche tra il gene *qui-1* e geni coinvolti in due processi molecolari che riguardano direttamente le ciglia sensoriali: la formazione delle ciglia sensoriale e la trasduzione del segnale.

L'analisi mediante Drop Test, della risposta al chinino, esibita da animali eterozigoti, che hanno 1 sola copia sia di *qui-1* che di un dato gene, coinvolto in uno dei due processi descritti.

In particolare è stata analizzata la risposta al chinino di mutanti in vari geni coinvolti nella chemiorecezione (descritti in tabella).

Sono stati costruiti doppi eterozigoti, tra *qui-1* ed i geni *gpa-3*, *odr-3*, *che-3*, *osm-6* e *gpa-13*. Le proteine codificate da questi geni sono descritte in tabella 4.

La risposta di evitamento al chinino di questi animali fig. suggerisce :

un'interazione genetica tra il gene *qui-1* ed i geni *gpa-3* e *odr-3*;

nessuna apparente interazione genetica tra il gene *qui-1* ed i geni *che-3*, *gpa-13*;

I dati suggeriscono una probabile interazione tra il gene *qui-1* ed il gene *osm-6*, ma dato l'esiguo numero di animali saggiati (n=17), questa analisi richiede un esame su un numero maggiore di animali. Non può essere esclusa l'interazione *osm-6*, ma la forte interazione con i geni *gpa-3* e *odr-3* suggerisce di indagare ulteriormente questa relazione.

Gene	Descrizione
<i>che-3</i>	formazione delle ciglia sensoriale
<i>osm-6</i>	formazione delle ciglia sensoriale
<i>gpa-13</i>	Subunità Gα delle proteine G eterotrimeriche espressa in ASH non coinvolta nella risposta al chinino
<i>gpa-15</i>	Subunità Gα delle proteine G eterotrimeriche espressa in ASH non coinvolta nella risposta al chinino
<i>gpa-3</i>	Subunità Gα delle proteine G eterotrimeriche coinvolta nella risposta al chinino
<i>odr-3</i>	Subunità Gα delle proteine G eterotrimeriche coinvolta nella risposta al chinino

Tabella 4 Descrizione dei geni oggetto di analisi di interazione genica con *qui-1*

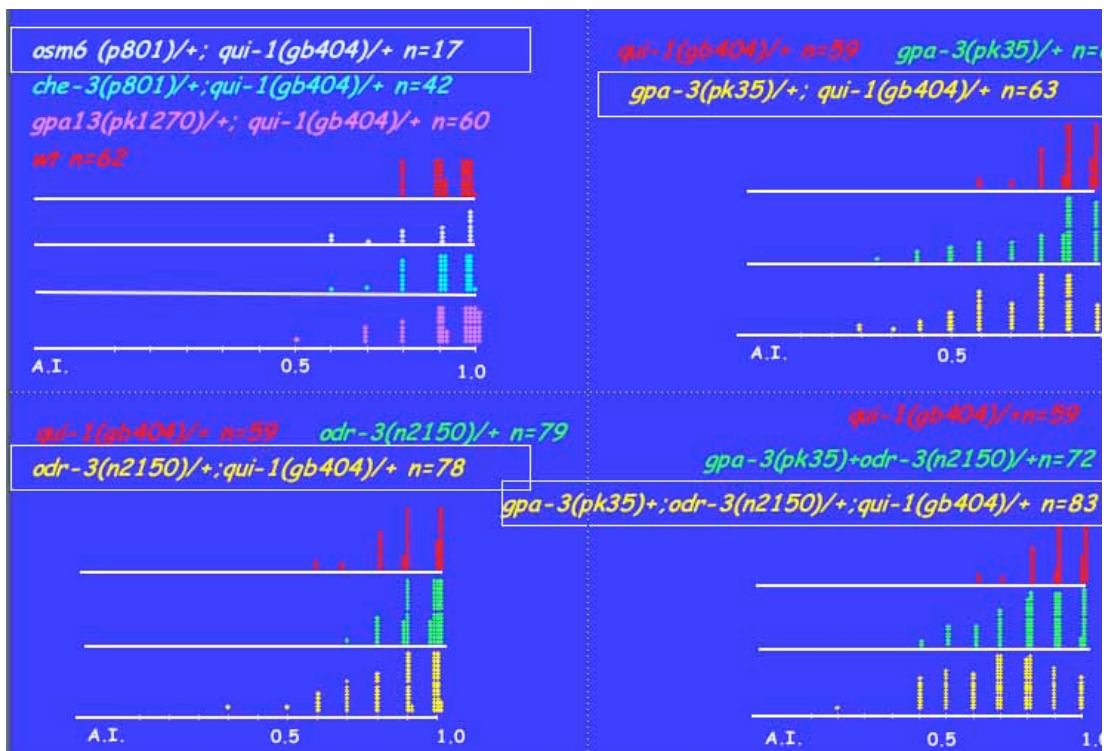


Fig.51 Diagramma dell'analisi di interazione genetica con il gene *qui-1* ed i geni *che-3*, *osm-6*, *qui-1*, *gpa-3*, *odr-3*, *gpa-13*. Ogni cerchietto rappresenta un animale eterozigote saggio con 10 gocce di chinino [10 mM].

Sovraespressione della proteina GPA-3 nel mutante *qui-1(gb404)*

Per esplorare l'interazione osservata tra i geni *qui-1* e *gpa-3* osservata nell'analisi comportamentale dei doppi eterozigoti è stata generata una linea mutante (*gb404*) per il gene *qui-1* sovraesprimente la proteina GPA-3. Questi animali non sono in grado di percepire il chinino e quindi la sovraespressione del gene *gpa-3* non è in grado di recuperare il fenotipo mutante del ceppo *qui-1(gb404)*.

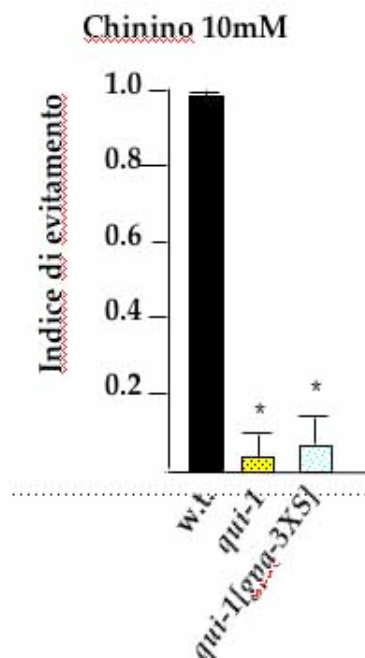


Fig.52 Risposta di evitamento esibita dal ceppo *qui-1(gb404)* transgenico per il sovraesprimente la subunità $G\alpha$ GPA-3.

Analisi della espressione della proteina GPA-3 nel mutante *qui-1(gb404)*

Un'ulteriore indagine è stata realizzata per esplorare l'interazione tra i geni *qui-1* e *gpa-3*. E' stata generata una linea mutante *qui-1(gb404)* per il gene *qui-1* che sovraesprime la proteina GPA-3 fusa al reporter GFP. L'analisi mediante microscopia confocale di questi animali non ha evidenziato differenze rispetto alla

linea trasformante per la sovraespressione della proteina GPA-3 fusa al reporter GFP, utilizzata per l'incrocio.

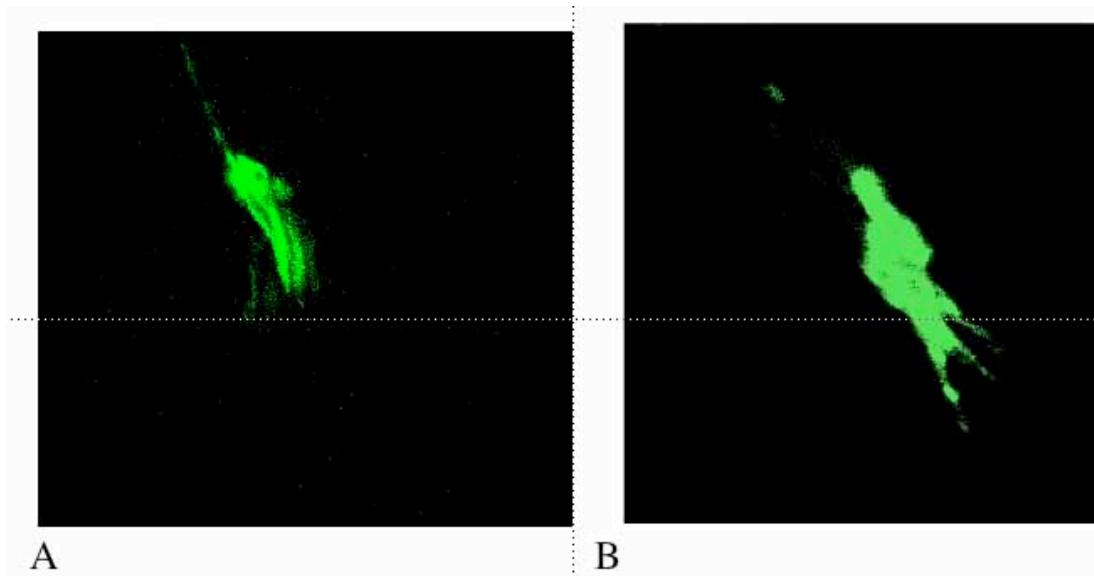


Fig.53 Analisi mediante microscopia confocale del ceppo mutante *qui-1(gb404)*, trangenico per il costrutto di fusione *gpa-3::gfp*. Anche se si osserva nel ceppo mutante *qui-1* (B) un accumulo di reporter non si osservano differenze significative rispetto al controllo.

Analisi delle interazioni genetiche tra il gene *qui-1* e le subunità $G\alpha$ *gpa-1* e *gpa-3*

Sono stati generati e analizzati comportamentalmente i doppi mutanti *gpa-1;qui-1*, *qui-1;gpa-3*, per verificare se la perdita di funzione dei geni *gpa-3* e *gpa-1* fosse in grado di recuperare la funzione genica del mutante nel gene *qui-1*. I doppi mutanti *qui-1;gpa-3* e *qui-1;gpa-1* esibiscono lo stesso fenotipo del mutante *qui-1*. Questo dato suggerisce che la funzione inibitoria esercitata dal gene *gpa-1* non agisce nella stessa via del segnale in cui partecipano *qui-1*. Fig.54

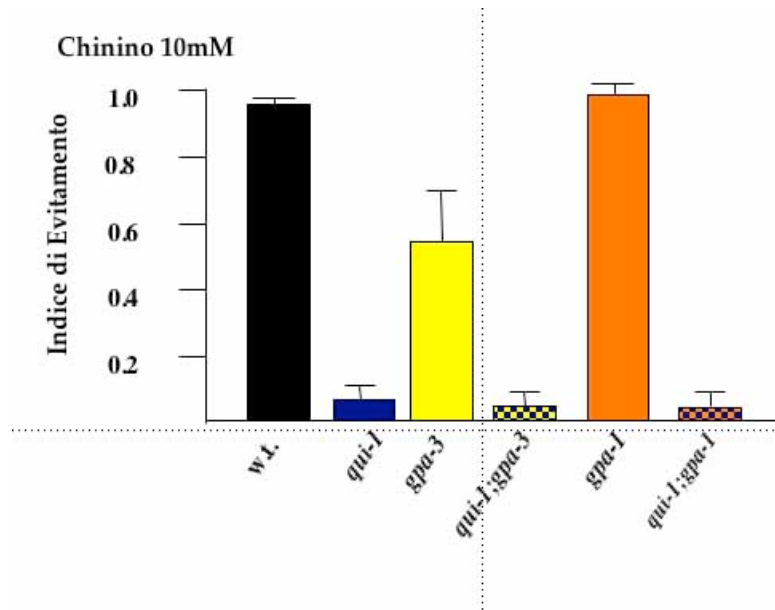


Fig.54 Analisi delle interazioni geniche tra i geni *qui-1*, *gpa-1* e *gpa-3*

Analisi delle interazioni genetiche tra il gene *qui-1* e le proteine Regolatorie del G Protein Signalling

Ulteriori saggi comportamentali sono stati condotti per stabilire una interazione genetica tra il gene *qui-1* ed i geni *egl-10*, *grk-2*, *arr-1*. Sono stati generati e analizzati comportamentalmente i doppi mutanti *qui-1;egl-10*; *qui-1;grk-2*. I doppi mutanti *qui-1;egl-10*; *qui-1;grk-2*; esibiscono un fenotipo completamente alterato nella risposta al chinino

La risposta di evitamento al chinino nel doppio mutanti *qui-1; arr-1* è completamente abolita. La mutazione nel gene *arr-1* non è in grado di recuperare il difetto generato dalla mutazione nel gene *qui-1*. (fig.55)

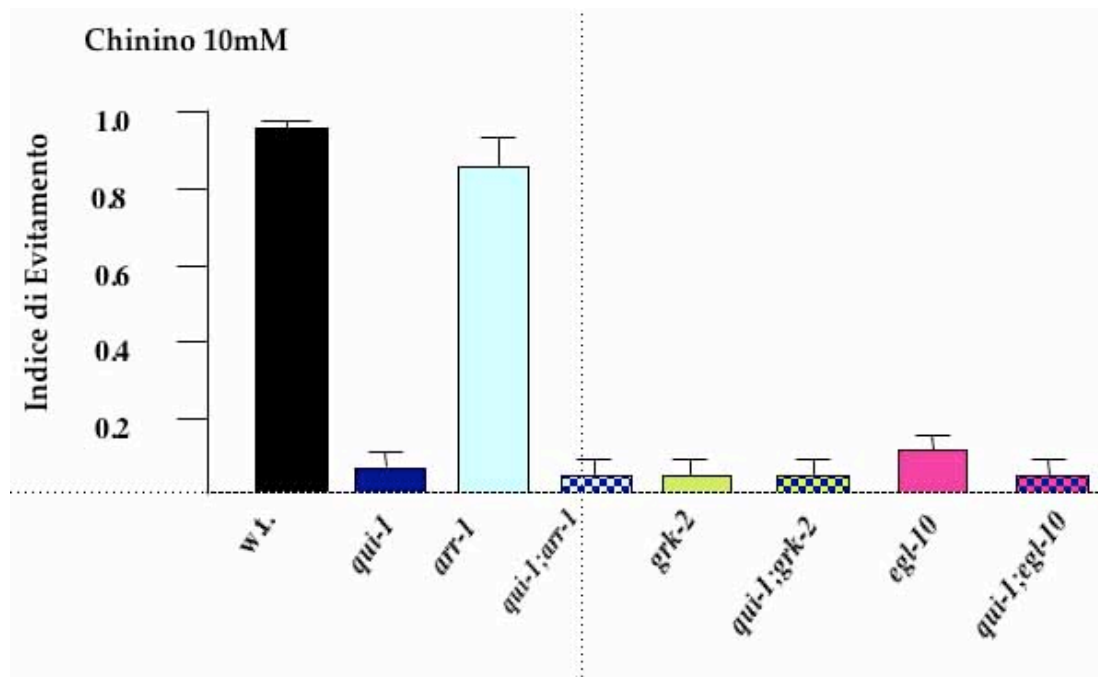


Fig.55 Analisi delle interazioni geniche tra i geni *qui-1*, *arr-1*, *grk-2*, *egl-10*.

Discussione

Molti composti tossici vengono percepiti come amari dall'uomo e inducono riflessi aversivi come la retrazione della lingua, la deglutizione ritardata, la nausea ed il vomito. Queste stesse sostanze amare sono scartate in saggi a doppia scelta in altri mammiferi (Glendinning, 1994).

C. elegans vive nel terreno all'interfaccia aria suolo e naviga il suo ambiente naturale attraverso la percezione sensoriale di stimoli meccanici, termici ma soprattutto chimici. La sua sopravvivenza richiede che necessariamente debba essere in grado di riconoscere predatori e composti potenzialmente tossici o situazioni potenzialmente dannose. *C. elegans* evita molti alcaloidi, un gruppo di sostanze prodotte dalle piante che, incluso il chinino, risultano tossiche per la maggior parte degli animali. L'evitamento in *C. elegans* e il gusto amaro nell'uomo sembrano far parte di una stessa strategia di difesa, positivamente selezionata nell'evoluzione, per sfuggire agli effetti dannosi di composti potenzialmente tossici. Questa analogia rende il nematode un sistema biologico modello per dissezionare la via di trasduzione del segnale necessaria per la percezione di un composto amaro. In particolare il vantaggio principale offerto da questo organismo è rappresentato dalla possibilità di facilitare la sintesi delle relazioni esistenti tra i geni responsabili di un comportamento chemiosensoriale, all'interno di un singolo neurone e all'interno di un circuito neurale.

Per identificare i geni coinvolti nel meccanismo di evitamento al chinino è stato utilizzato l'approccio del miglior candidato. Sulla base delle informazioni disponibili in letteratura, relative ai meccanismi molecolari coinvolti nella sensibilità chimica, nel presente lavoro sono stati testati, mediante Drop Test, animali mutanti in geni codificanti i componenti molecolari della via di trasduzione del segnale mediata dalle Proteine G eterotrimeriche.

In particolare, sono stati analizzati :

- mutanti in geni codificanti subunità $G\alpha$ (*gpa-1*, *gpa-3*, *odr-3*, *gpa-13*, *gpa-15*, *goa-1*, *egl-30*);
- mutanti in geni codificanti subunità $G\beta$, (*gpb-2*);
- mutanti in geni codificanti proteine RGS, regolatori della trasduzione del segnale di proteine G eterotrimeriche (*egl-10*, *eat-16*; *arr-1*).

Inoltre è stata analizzata la risposta comportamentale di mutanti in geni codificanti canali ionici appartenenti alla famiglia TRPV (transient potential receptor vanilloid), richiesti per le risposte di evitamento mediate da ASH (*osm-9*, *ocr-1*); mutanti in geni codificanti il trasportatore vescicolare del glutammato (*eat-4*), e mutanti nel

gene codificante il recettore del glutammato (*glr-1*) coinvolti nella neurotrasmissione.

Nel presente lavoro di tesi di dottorato di ricerca è stato dimostrato che anche in *C. elegans* come nei mammiferi e nell'uomo la percezione di un composto "amaro" è mediato dalla via di trasduzione del segnale delle proteine G-eterotrimeriche. Ed è stato evidenziato come un semplice comportamento chemiosensoriale, in *C. elegans*, quale la reazione di evitamento al chinino, è mediata da numerosi componenti molecolari. In questa analisi sono stati individuati otto geni coinvolti per la risposta al chinino (*gpa-3*, *odr-3*, *gpa-1*; *goa-1*; *egl-30*; *egl-10*, *osm-9*, *eat-4*).

Le subunità G α coinvolte nell'evitamento al chinino svolgono funzioni ridondanti e contrastanti

Le subunità G-alfa GPA-3, ODR-3 sono necessarie all'evitamento al chinino, svolgono una funzione ridondante e partecipano ad una via stimolatoria. La subunità G-alfa GPA-3 svolge un ruolo maggiore nella percezione del chinino, mentre la funzione di ODR-3 viene mascherata da GPA-3 ed evidenziata solo quando la funzione di quest'ultima viene persa. La sua funzione viene messa in luce dall'analisi del doppio mutante *gpa-3*; *odr-3*, che perde completamente la capacità di evitare il chinino. Il fatto che il mutante *gpa-3* presenti un fenotipo difettivo parziale e che il mutante *odr-3* non evidenzi difetti comportamentali, suggerisce che nella selezione per la ricerca dei mutanti che hanno perso la capacità di evitare il chinino, molti geni sono difficilmente individuabili dal momento che il loro difetto parziale limita l'approccio di genetica diretta, nel quale solo mutanti che presentino un fenotipo severo possono esser facilmente individuati e studiati attraverso l'analisi genetica.

La sovraespressione del gene codificante la subunità G α GPA-1 è sufficiente ad indurre difetti nella percezione del chinino; questa subunità G α sembra svolgere un ruolo inibitorio; la sovraespressione in ASH del gene codificante la subunità G α GOA-1 è sufficiente ad indurre difetti nella percezione del chinino: questa subunità G α sembra svolgere un ruolo inibitorio in questo neurone;

Una mutazione nel gene *gpa-1* sopprime gli effetti generati dalla perdita di funzione del gene *gpa-3*, e parzialmente quelli generati dalla perdita di funzione del gene *gpa-3* combinata con quella di *odr-3*; la proteina GPA-1 sembrerebbe agire in una via di trasduzione opposta a quella di GPA-3;

La sensibilità al chinino è quindi mediata da almeno due subunità G α stimolatorie GPA-3 e ODR-3. Il doppio mutante nei geni codificanti queste proteine perde

completamente la capacità di evitare il chinino. Questo dato comportamentale è stato confermato da risultati successivi ed indipendenti da questa tesi (Hilliard et al. 2005). In questi animali sono aboliti i flussi di calcio di ASH in animali vivi stimolati con il chinino.

GPA-3 e ODR-3, sembrano essere le uniche subunità stimolatorie coinvolte nella recezione del chinino in ASH. Questo neurone, oltre a GPA-3, esprime anche le subunità $G\alpha$ GPA-1, GPA-11, GPA-13, GPA-14, GPA-15 e GOA-1.

La normale capacità di evitare il chinino osservata nel doppio mutante *gpa-1;gpa-3* indica una interazione genetica tra questi due geni, entrambi espressi in ASH ed in ADL, che svolge un ruolo minore nell'evitamento al chinino. La parziale capacità di evitare il chinino (I.E. 0,55) osservata nel triplo mutante *gpa-1;gpa-3;odr-3* suggerisce *gpa-1* agisca su un'altra subunità $G\alpha$ con funzione stimolatoria. Potrebbe essere interessante studiare la risposta comportamentale di evitamento del triplo mutante *goa-1;odr-3;gpa-3*.

Sarebbe inoltre, interessante esplorare sia il ruolo di GPA-3 e la sua relazione con altre subunità $G\alpha$, nei neuroni sensoriali ASK, ADL, PHA e PHB, che svolgono un ruolo minore nell'evitamento al chinino. In particolare sarebbe interessante studiare in ASK la relazione tra GPA-3, GPA-2, GPA-14 e GPA-15 e in ADL la relazione tra GPA-3, GPA-1, GPA-15. Lo scopo sarebbe quello di individuare subunità $G\alpha$ stimolatorie ed inibitorie in questi neuroni.

Il sistema chemiosensoriale in assenza di stimoli è in equilibrio

Sebbene non sia ancora stato chiarito in quale cellula le subunità $G\alpha$ inibitorie svolgano la loro funzione si può ipotizzare che l'attività cellulare del sistema chemiosensoriale, in assenza di stimoli tossici non sia inerte. Un equilibrio tra vie di trasduzione con funzionalità opposte rende il neurone pronto a percepire lo stimolo chemiorepellente.

Un risultato interessante riguarda la scoperta del coinvolgimento di vie di trasduzione del segnale stimolatorie (GPA-3, ODR-3) e vie inibitorie (GPA-1, GOA-1).

Componenti regolatori svolgono funzioni necessarie e non ridondanti

Il mutante nel gene *egl-10*, codificante una proteina contenente il dominio RGS (*Regulator G Protein Signalling*) esibisce gravi difetti nell'evitare il chinino, ma riesce a reagire al tocco su muso. La proteina EGL-10 è necessaria nella via trasduzione al chinino; la perdita di funzione del gene *eat-16*, codificante una proteina contenente il

dominio RGS, sopprime gli effetti generati dalla perdita di funzione del gene *egl-10*. I geni *egl-10* e *eat-16* agiscono in vie di trasduzione opposte coinvolte nella percezione del chinino

L'identificazione del gene *egl-10* suggerisce un'importante considerazione:

una mutazione di un gene con una funzione regolatoria abolisce la capacità di evitare il chinino e quindi difetti nei meccanismi molecolari regolatori aboliscono funzioni biologiche. Al contrario di componenti quali GPA-3 e ODR-3, per questa classe di componenti regolativi, funzioni geniche ridondanti non agiscono nei meccanismi regolativi.

Si potrebbe ipotizzare che il difetto osservato nel mutante *egl-10* sia dovuto ad una mancata inibizione esercitata dalla proteina EGL-10 su una subunità $G\alpha$ inibitoria, che non è GPA-1, come ha evidenziato l'analisi del doppio mutante *egl-10; gpa-1*. (Un possibile candidato per questa funzione è rappresentato dalla proteina GOA-1). Quando manca la funzione inibitoria del gene *egl-10*, la subunità $G\alpha$ inibitoria, da esso regolato, resta sempre attiva e sbilancia l'equilibrio tra la via inibitoria e stimolatoria, rendendo il nematode incapace di rispondere allo stimolo chimico percepito.

Il ruolo reciproco di EGL-10 e GOA-1 deve essere indagato e potrebbe essere svolto in ASH.

Si noti che anche se l'espressione del gene *egl-10* in ASH recupera la capacità di evitare il chinino nei mutanti del gene *egl-10* un'ulteriore indagine deve essere condotta per confermare questo dato. Gli animali trasformanti sono anche iperattivi. E quindi è necessario utilizzare per l'esperimento di recupero del fenotipo, la sequenza codificante del gene (c-DNA) priva di introni, che potrebbero contenere regioni regolative che guidino l'espressione di *egl-10* anche in altre sedi oltre ad specificamente espresso in ASH.

Il chinino agisce su un recettore a serpentina o attiva direttamente le subunità $G\alpha$?

Dal presente studio non è possibile stabilire se esista in *C. elegans* un recettore a serpentina specifico per il chinino, dal momento che questo composto amfifilico, potrebbe agire attivando direttamente le subunità $G\alpha$ stimolatorie, come è noto dalla letteratura.

Il locus genetico *qui-1*: IX esoni, trascrive un unico RNA messaggero espresso in ASH

Per quanto riguarda la caratterizzazione del nuovo gene *qui-1* esperimenti di RT-PCR e RACE (Rapid Amplification of C-DNA End) hanno individuato un trascritto unico comprendente 4 esoni aggiuntivi all'estremità 5' del gene precedentemente descritto. Il gene *qui-1* si configura come un gene inusualmente lungo per *C. elegans* comprendendo 19 esoni e 18 introni. La completa regione genomica codificante dall'ATG al TAA è composta da 12469 bp. L'RNA messaggero è lungo 4868 bp presenta una cornice di lettura aperta di 1592 aa.

L'analisi del profilo di espressione suggerisce la presenza di regioni regolative interne.

Il reporter è visibile nei processi del nerve ring, inclusi i neuroni ASH e ADL, necessari per l'evitamento del chinino. Il reporter è anche espresso in un neurone nel ganglio anteriore, in sette neuroni del ganglio laterale e ventrale, in quattro neuroni addizionali del ganglio retrovescicolare e undici neuroni nel ganglio lombare, PVQ ed il neurone sensoriale PHB. L'espressione di QUI-1 in ASH e ADL suggerisce che per il suo ruolo nell'evitamento del chinino, funziona in questi neuroni. A conferma di questa ipotesi è stato ottenuto un recupero della capacità di evitare il chinino nel mutante *qui-1gb404*, dirigendo selettivamente l'espressione del gene in ASH.

QUI-1 localizza sulle ciglia sensoriali e contiene nella regione ammino-terminale un dominio RGS ed un dominio NACHT

Esperimenti di immunolocalizzazioni su animali in toto evidenziano la localizzazione della proteina QUI-1 sulla estremità delle ciglia sensoriali. Questo compartimento cellulare è esposto all'ambiente esterno ed è direttamente coinvolto nella percezione chemiosensoriale in *C. elegans* e colloca l'attività funzionale questa proteina circoscritta a questo compartimento cellulare.

L'analisi della sequenza aminoacidica rivela che la proteina QUI-1 si caratterizza per la presenza nell'estremità amino-terminale di un dominio RGS, un sito (P-loop) che lega nucleotidi (GTP o ATP), che fa parte di un dominio proteico di recente identificazione (Konrad et al. 2000), il NACHT. Nella estremità carbossiterminale è localizzata una regione ricca di domini WD-40 (il programma SMART, ne riconosce fino a 12). Questo motivo è tipico di interazioni proteina-proteina. L'assenza di segnali di determinazione nucleare o citoplasmatica caratterizza la proteina QUI-1 come un fattore citoplasmatico.

La caratteristica composizione in domini, potrebbe identificare QUI-1 come capostipite della undicesima classe di proteine RGS, collocando questa proteina nella via di trasduzione del segnale mediata dalle proteine G eterotrimeriche.

***qui-1* è epistatico su geni codificanti subunità G α e regolatori di “G protein signalling”**

Per esplorare la funzione molecolare della proteina QUI-1 è stato adottato un approccio basato sull'analisi, delle interazioni genetiche, tra il gene *qui-1* e geni coinvolti in due processi molecolari che riguardano direttamente le ciglia sensoriali: la formazione delle ciglia sensoriale e la trasduzione del segnale.

L'analisi mediante Drop Test, della risposta al chinino, esibita da animali eterozigoti, che hanno 1 sola copia sia di *qui-1* che di un dato gene, coinvolto in uno dei due processi descritti suggerisce un'interazione genetica tra il gene *qui-1* ed i geni *gpa-3* e *odr-3*. Per esplorare questa interazione sono stati condotti ulteriori esperimenti. Tuttavia la sovraespressione della proteina GPA-3 non è in grado di recuperare la capacità di percepire il chinino nel mutante (*gb404*) del il gene *qui-1*. Né si osserva un'alterata localizzazione della proteina GPA-3 nel mutante (*gb404*) per il gene *qui-1*.

Una spiegazione di questi risultati potrebbe essere che nel primo caso la funzione di GPA-3 richieda la funzione di QUI-1 e quindi pur essendo presente in eccesso, la proteina GPA-3, mancando dell'attivazione non è in grado di funzionare. L'analisi di un'interazione fisica tra QUI-1 e GPA-3, potrebbe essere condotta per indagare ulteriormente sull'interazione genetica.

Il secondo esperimento indicherebbe che QUI-1 non agisce come trasportatore di GPA-3.

Inoltre linee overesprimenti il gene *qui-1* in maniera generalizzata e linee overesprimenti il gene *qui-1* selettivamente in ASH, non mostrano difetti nel percepire il chinino, né sono ipersensibili. Questo gene, necessario nella percezione del chinino, se in eccesso non produce effetti dannosi al meccanismo molecolare di evitamento, né rende i nematodi ipersensibili.

L'analisi comportamentale condotta per stabilire una interazione genetica tra il gene *qui-1* ed i geni *gpa-1*, *egl-10*, *grk-2*, *gpa-3*, *arr-1* non ha portato all'individuazione di un gene soppressore. L'analisi dei doppi mutanti *qui-1; grk-2*, *qui-1;gpa-1*; *qui-1;gpa-3*, *qui-1; egl-10*, evidenzia che il gene *qui-1* è epistatico su *gpa-1* e *gpa-3* e la combinazione con *grk-2* o *egl-10* non permette di migliorare la capacità di evitare il chinino.

La funzione molecolare di *qui-1*, pur essendo largamente indagata non è stata individuata.

Ipotesi sulla funzione molecolare di *qui-1*

Una considerazione in merito alla funzione molecolare svolta dal gene *qui-1* può derivare da un'osservazione: gli unici singoli mutanti noti che hanno perso completamente la capacità di evitare il chinino e presentano ciglia sensoriali integre sono i mutanti nei geni *qui-1*, *egl-10* e *grk-2*.

Le proteine EGL-10 e GRK-2 contengono entrambe un dominio RGS e sono coinvolte nella via di trasduzione del segnale mediata dalle Proteine G eterotrimeriche suggerendo che esse svolgano una funzione regolatoria. L'analisi della sequenza aminoacidica della proteina QUI-1 rivela la presenza di un dominio RGS e sembra porre la funzione della proteina QUI-1 nella via di trasduzione del segnale mediata dalle Proteine G eterotrimeriche.

Due ipotesi possono essere formulate per la funzione di *qui-1*:

- o è un elemento regolativo, necessario per la funzione di GPA-3 e ODR-3;
- o la proteina QUI-1 è un effettore a valle di GPA-3 e ODR-3;

Per indagare sulla prima possibilità, si potrebbe verificare se le proteine mutanti GPA-3QL e ODR-3QL costitutivamente attivate recuperano la capacità di evitare il chinino dei mutanti *qui-1(gb404)*. Per indagare sulla seconda possibilità, si potrebbe verificare se le proteine mutanti QUI-1 costitutivamente attivata è in grado di recuperare la capacità di evitare il chinino del doppio mutante *gpa-3;odr-3*. Oppure, in parallelo all'esplorazione della funzione di EGL-10, si potrebbe indagare l'interazione genetica tra *qui-1* e *goa-1*. Se il doppio mutante in questi due geni fosse responsivo al chinino, la mutazione in *goa-1* sopprimerebbe il difetto indotto dalla mutazione *qui-1*. In tal caso verrebbe messa in evidenza la funzione inibitoria della proteina QUI-1 su una subunità G α .

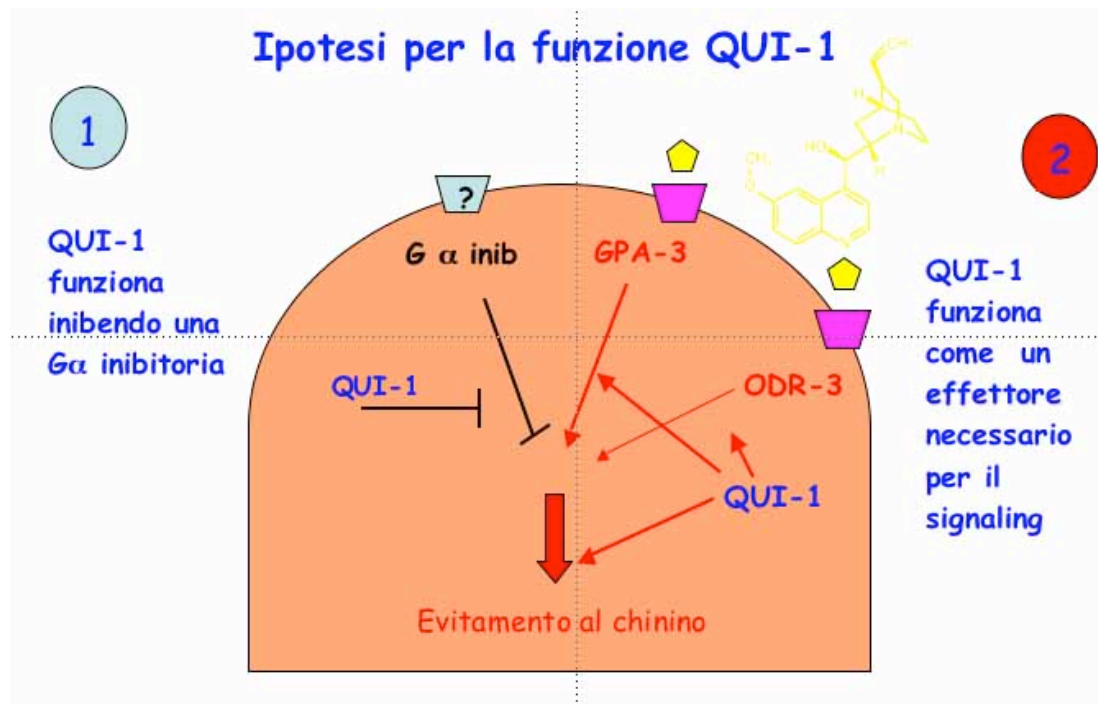


Fig.56 Ipotesi della funzione molecolare esercitata dalla proteina QUI-1

Conclusioni

Concludendo la discussione dei risultati ottenuti nel presente lavoro di dottorato di ricerca, si può stabilire che l'approccio del miglior candidato si è rivelato un utile strumento per individuare componenti molecolari coinvolti nell'evitamento al chinino. L'analisi genetica in *C. elegans* ancora una volta ha mostrato la sua validità per dissezionare una via di trasduzione del segnale, che tra l'altro è coinvolta in una risposta fisiologica complessa, quale la risposta comportamentale indotta da una percezione chemiosensoriale. Questo approccio ha consentito di stabilire che anche in *C. elegans* la via di traduzione del segnale mediato dalle proteine G eterotrimeriche svolge un ruolo chiave nella percezione chemiosensoriale di composti tossici.

Hilliard, M. A., Bergamasco, C., Arbucci, S., Plasterk, R. H. and Bazzicalupo, P. (2004).

Worms taste bitter: ASH neurons, QUI-1, GPA-3 and ODR-3 mediate quinine avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* **23**, 1101-11.

L'analisi dei doppi mutanti ha messo in evidenza funzioni geniche ridondanti e l'esame comportamentali di mutanti allelici per perdita di funzione e per sovraespressione ha consentito di individuare funzioni stimolatorie e inibitorie. Da questo studio è emerso che anche in un organismo semplice, quale *C. elegans* complessa è la rete delle relazioni molecolari che presiedono ad una risposta comportamentale. Vie di trasduzione parallele, con funzione ridondante sono

bilanciate da vie inibitorie. Una fine regolazione controlla un delicato equilibrio in cui il sistema sensoriale si trova in assenza di stimolazioni. La completa abolizione di mutanti nei geni *grk-2* e *egl-10*, appartenenti alla famiglia delle proteine RGS, suggerisce che la regolazione dell'equilibrio tra le vie stimolatore ed inibitorie esercita un ruolo cruciale, forse più importante di quello esercitato dalle singole vie stimolatorie e inibitorie.

Per quanto riguarda il gene *qui-1*, l'ampia caratterizzazione ottenuta colloca la sua funzione nel neurone ASH, sulla ciglia sensoriale, un compartimento cellulare interessato precocemente nella sensibilità chimica.

La sua funzione molecolare purtroppo resta ignota.

Tuttavia l'individuazione di omologhi in altre specie, compreso l'uomo e l'identificazione del dominio RGS rende particolarmente interessante il proseguimento dello studio di questo gene, data la sua composizione in domini, completamente nuova, e data la sua conservazione evolutiva. Queste due caratteristiche, infatti, ed il coinvolgimento della via di trasduzione del segnale delle proteine G eterotrimeriche, accrescono l'interesse scientifico per questo progetto.

Lo studio del meccanismo molecolare di evitamento al chinino potrebbe diventare un buon sistema biologico modello per dissezionare la via di trasduzione del segnale delle proteine G eterotrimeriche. Non solo per indagare le relazioni reciproche tra componenti noti di questa via, ma anche per individuare nuove componenti. L'interesse deriva dal fatto che questo processo di trasduzione è stato selezionato largamente nell'evoluzione ed è stato adottato dalle cellule per convertire numerose variazioni d'informazioni extracellulari in variazioni di funzioni intracellulari. Segnali extracellulari sono molecole volatili, luce, forze meccaniche, composti che riflettono lo stato metabolico, ioni, ormoni, fattori di crescita, neurotrasmettitori. Un complesso meccanismo molecolare di trasduzione, trasmissione, modulazione degli effettori, risposta e terminazione segue il riconoscimento dello stimolo. La delucidazione di questi meccanismi assume un valore sempre crescente, sia per un interesse mero di ricerca di base, legato alla conoscenza di processi di sviluppo, comunicazione cellula – cellula, cellula – ambiente, sia per la rilevanza clinica che questa potrebbe avere nella cura di patologie in cui la trasduzione del segnale è aberrante. Molti lavori ad esempio indicano un coinvolgimento delle proteine G eterotrimeriche (Beaumont KA, 2005) (Fuessel S, 2005; Fukumoto K, 2005) (Koga H, 2004) (Hait NC, 2005) nella patogenesi del cancro. Alcune di esse hanno direttamente capacità trasformante.

Dato il ruolo delle RGS nel modulare il "signaling" delle proteine G non è sorprendente che molti lavori riportino il coinvolgimento di proteine RGS nel

cancro o in pathway chiaramente coinvolti nel cancro ((Buckbinder L, 1997; Fukuhara S, 2001); (Tonjes A, 2004) (Schwable J, 2005).

Sfruttando tutti gli approcci - genetico molecolari utilizzabili nello studio di *C. elegans* l'identificazione della funzione molecolare e cellulare della nuova classe di proteine identificata da QUI-1, potrebbe portare alla scoperta di un nuovo target terapeutico/farmacologico.

E' forse appropriato ricordare che oltre il 50 per cento dei farmaci attualmente in commercio ha come target uno dei componenti del "signalling" mediato dalle proteine G.

Molti farmaci agiscono come ligandi (agonisti o antagonisti), altri hanno come bersaglio le proteine G, altri ancora come effettori. Esiste al momento un nuovo grande sforzo per utilizzare come bersaglio di nuovi farmaci le proteine RGS.

In questo contesto la caratterizzazione di una nuova classe di proteine RGS riveste, potenzialmente, notevole interesse.

Bibliografia

- Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J. and Zuker, C. S.** (2000). A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* **100**, 693-702.
- Bargmann, C. I.** (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* **282**, 2028-33.
- Bargmann, C. I., Hartwig, E. and Horvitz, H. R.** (1993). Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* **74**, 515-27.
- Bargmann, C. I. and Horvitz, H. R.** (1991). Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron* **7**, 729-42.
- Bargmann, C. I., Thomas, J. H. and Horvitz, H. R.** (1990). Chemosensory cell function in the behavior and development of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **55**, 529-38.
- Beaumont KA, N. R., Smit DJ, Leonard JH, Stow JL, Sturm RA.** (2005). Altered cell surface expression of human MC1R variant receptor alleles associated with red hair and skin cancer risk. *Hum Mol Genet* **15**, 2145-54.
- Behrens, M., Brockhoff, A., Kuhn, C., Bufe, B., Winnig, M. and Meyerhof, W.** (2004). The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 479-85.
- Brenner, S.** (1974a). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Brenner, S.** (1974b). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Buckbinder L, V.-M. S., Chen Y.** (1997). The p53 tumor suppressor targets a novel regulator of G protein signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7868-72.
- Bufe, B., Breslin, P. A., Kuhn, C., Reed, D. R., Sharp, C. D., Slack, J. P., Kim, U. K., Drayna, D. and Meyerhof, W.** (2005). The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr Biol* **15**, 322-7.
- Bufe, B., Hofmann, T., Krautwurst, D., Raguse, J. D. and Meyerhof, W.** (2002). The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides. *Nat Genet* **32**, 397-401.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. and Julius, D.** (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816-24.
- Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C. S. and Ryba, N. J.** (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* **100**, 703-11.
- Chaudhari, N., Landin, A. M. and Roper, S. D.** (2000). A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nat Neurosci* **3**, 113-9.
- Clapp, T. R., Stone, L. M., Margolskee, R. F. and Kinnamon, S. C.** (2001). Immunocytochemical evidence for co-expression of Type III IP3 receptor with signaling components of bitter taste transduction. *BMC Neurosci* **2**, 6.
- Colbert, H. A., Smith, T. L. and Bargmann, C. I.** (1997). OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **17**, 8259-69.

Consortium, T. C. e. S. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012-8.

Cuppen, E., A. M. Van Der Linden, G. Jansen and R.H.A. Plasterk. (2003). Proteins interacting with *Caenorhabditis elegans* Gα subunits. *Comp. Funct. Genomics* **4**, 479-491.

Fuessel S, W. B., Schmidt U, Baretton G, Koch R, Bachmann M, Rieber EP, Wirth MP, Meye A. (2005). Transcript quantification of Dresden G protein-coupled receptor (D-GPCR) in primary prostate cancer tissue pairs. *Cancer Lett.*

Fukuhara S, C. H., Gutkind JS. (2001). RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene* **20**, 1661-8.

Fukumoto K, Y. Y., Virgona N, Hagiwara H, Sato H, Senba H, Suzuki K, Asano R, Yamada K, Yano T. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor delta as a molecular target to regulate lung cancer cell growth. *J Neurosci.* **26**, 6119-26.

Fukuto, H. S., Ferkey, D. M., Apicella, A. J., Lans, H., Sharmeen, T., Chen, W., Lefkowitz, R. J., Jansen, G., Schafer, W. R. and Hart, A. C. (2004). G protein-coupled receptor kinase function is essential for chemosensation in *C. elegans*. *Neuron* **42**, 581-93.

Glendinning, J. I. (1994). Is the bitter rejection response always adaptive? *Physiol Behav* **56**, 1217-27.

Hait NC, S. S., Le Stunff H, Mikami A, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. (2005). Role of sphingosine kinase 2 in cell migration towards epidermal growth factor. *Cell Signal.*

Hilliard, M. A., Apicella, A. J., Kerr, R., Suzuki, H., Bazzicalupo, P. and Schafer, W. R. (2005). In vivo imaging of *C. elegans* ASH neurons: cellular response and adaptation to chemical repellents. *Embo J* **24**, 63-72.

Hilliard, M. A., Bargmann, C. I. and Bazzicalupo, P. (2002a). *C. elegans* responds to chemical repellents by integrating sensory inputs from the head and the tail. *Curr Biol* **12**, 730-4.

Hilliard, M. A., Bargmann, C. I. and Bazzicalupo, P. (2002b). *C. elegans* Responds to Chemical Repellents by Integrating Sensory Inputs from the Head and the Tail. *Curr Biol* **12**, 730-4.

Hilliard, M. A., Bergamasco, C., Arbucci, S., Plasterk, R. H. and Bazzicalupo, P. (2004). Worms taste bitter: ASH neurons, QUI-1, GPA-3 and ODR-3 mediate quinine avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* **23**, 1101-11.

Huang, L., Shanker, Y. G., Dubauskaite, J., Zheng, J. Z., Yan, W., Rosenzweig, S., Spielman, A. I., Max, M. and Margolskee, R. F. (1999). Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nat Neurosci* **2**, 1055-62.

Jansen, G., Thijssen, K. L., Werner, P., van der Horst, M., Hazendonk, E. and Plasterk, R. H. (1999a). The complete family of genes encoding G proteins of *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* **21**, 414-9.

Jansen, G., Thijssen, K. L., Werner, P., van der Horst, M., Hazendonk, E. and Plasterk, R. H. (1999b). The complete family of genes encoding G proteins of *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* **21**, 414-9.

Jansen, G., Weinkove, D. and Plasterk, R. H. (2002). The G-protein gamma subunit gpc-1 of the nematode *C. elegans* is involved in taste adaptation. *Embo J* **21**, 986-94.

- Kaplan, J. M. and Horvitz, H. R.** (1993). A dual mechanosensory and chemosensory neuron in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2227-31.
- Kim, U. K., Jorgenson, E., Coon, H., Leppert, M., Risch, N. and Drayna, D.** (2003). Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science* **299**, 1221-5.
- Koelle, G. A. P. a. M. R.** (2002). An N-terminal Region of *Caenorhabditis elegans* RGS Proteins EGL-10 and EAT-16 Directs Inhibition of Go Versus Gq Signaling. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **277**, 47004–47013.
- Koga H, I. K., Ueda M, Hishizawa M, Uchiyama T.** (2004). Identification of differentially expressed molecules in adult T-cell leukemia cells proliferating in vivo. *Cancer Sci* **5**, 411-7.
- Lans, H., Rademakers, S. and Jansen, G.** (2004). A network of stimulatory and inhibitory Galpha-subunits regulates olfaction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **167**, 1677-87.
- Lefkowitz, R. J. and Shenoy, S. K.** (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* **308**, 512-7.
- Lindemann, B.** (1996). Taste reception. *Physiol Rev* **76**, 718-66.
- Lindemann, B.** (2001). Receptors and transduction in taste. *Nature* **413**, 219-25.
- Matsunami, H., Montmayeur, J. P. and Buck, L. B.** (2000). A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* **404**, 601-4.
- Meyerhof, W., Behrens, M., Brockhoff, A., Bufe, B. and Kuhn, C.** (2005). Human bitter taste perception. *Chem Senses* **30 Suppl 1**, i14-i15.
- Mori, I. and Ohshima, Y.** (1995). Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **376**, 344-8.
- Mueller, K. L., Hoon, M. A., Erlenbach, I., Chandrashekar, J., Zuker, C. S. and Ryba, N. J.** (2005). The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature* **434**, 225-9.
- Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N. J. and Zuker, C. S.** (2002). An amino-acid taste receptor. *Nature* **416**, 199-202.
- Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J. and Zuker, C. S.** (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell* **106**, 381-90.
- Nelson, T. M., Munger, S. D. and Boughter, J. D., Jr.** (2005). Haplotypes at the Tas2r locus on distal chromosome 6 vary with quinine taste sensitivity in inbred mice. *BMC Genet* **6**, 32.
- Neubig RR, S. D.** (2002). Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* **3**, 187-97.
- Ou, G., Blacque, O. E., Snow, J. J., Leroux, M. R. and Scholey, J. M.** (2005). Functional coordination of intraflagellar transport motors. *Nature* **436**, 583-7.
- Perez, C. A., Huang, L., Rong, M., Kozak, J. A., Preuss, A. K., Zhang, H., Max, M. and Margolskee, R. F.** (2002). A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* **5**, 1169-76.
- Perkins, L. A., Hedgecock, E. M., Thomson, J. N. and Culotti, J. G.** (1986). Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **117**, 456-87.
- Rosler, P., Boekhoff, I., Tareilus, E., Beck, S., Breer, H. and Freitag, J.** (2000). G protein betagamma complexes in circumvallate taste cells involved in bitter transduction. *Chem Senses* **25**, 413-21.
- Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E. F.** (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.

Schwable J, C. C., Thiede C, Tickenbrock L, Sargin B, Steur C, Rehage M, Rudat A, Brandts C, Berdel WE, Muller-Tidow C, Serve H. (2005). RGS2 is an important target gene of Flt3-ITD mutations in AML and functions in myeloid differentiation and leukemic transformation. *5*, 2107-14.

Shi, P., Zhang, J., Yang, H. and Zhang, Y. P. (2003). Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in Mammalian evolution. *Mol Biol Evol* **20**, 805-14.

Siderovski, D. P. and Willard, F. S. (2005). The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int J Biol Sci* **1**, 51-66.

Soranzo, N., Bufe, B., Sabeti, P. C., Wilson, J. F., Weale, M. E., Marguerie, R., Meyerhof, W. and Goldstein, D. B. (2005). Positive selection on a high-sensitivity allele of the human bitter-taste receptor TAS2R16. *Curr Biol* **15**, 1257-65.

Tobin, D., Madsen, D., Kahn-Kirby, A., Peckol, E., Moulder, G., Barstead, R., Maricq, A. and Bargmann, C. (2002). Combinatorial expression of TRPV channel proteins defines their sensory functions and subcellular localization in *C. elegans* neurons. *Neuron* **35**, 307-18.

Tonjes A, M. S., Holzapfel HP, Eszlinger M, Arkenau C, Paschke R. (2004). Expression of regulators of g protein signaling mRNA is differentially regulated in hot and cold thyroid nodules. *Thyroid* **11**, 896-901.

Troemel, E. R., Chou, J. H., Dwyer, N. D., Colbert, H. A. and Bargmann, C. I. (1995). Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell* **83**, 207-18.

Troemel, E. R., Kimmel, B. E. and Bargmann, C. I. (1997). Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*. *Cell* **91**, 161-9.

von Buchholtz, L., Elischer, A., Tareilus, E., Gouka, R., Kaiser, C., Breer, H. and Conzelmann, S. (2004). RGS21 is a novel regulator of G protein signalling selectively expressed in subpopulations of taste bud cells. *Eur J Neurosci* **19**, 1535-44.

Ward, S., Thomson, N., White, J. G. and Brenner, S. (1975). Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* **160**, 313-37.

White, J., Southgate, E., Thomson, J. N. and Brenner, S. (1987). The structure of the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Phil. Trans. R. Soc. Lon.* **314**, 1-340.

Wong, G. T., Gannon, K. S. and Margolskee, R. F. (1996). Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* **381**, 796-800.

Yan, W., Sunavala, G., Rosenzweig, S., Dasso, M., Brand, J. G. and Spielman, A. I. (2001). Bitter taste transduced by PLC-beta(2)-dependent rise in IP(3) and alpha-gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C742-51.

Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C. S. and Ryba, N. J. (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* **112**, 293-301.

Zwaal, R. R., Mendel, J. E., Sternberg, P. W. and Plasterk, R. H. (1997). Two neuronal G proteins are involved in chemosensation of the *Caenorhabditis elegans* Dauer-inducing pheromone. *Genetics* **145**, 715-27.

